UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1950 — N° 5

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE D'UN CONSTITUANT DU LIÈGE : L'ACIDE PHLOÏONIQUE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement le 26 JUIN 1950

PAR

Olivier Georges CÉSAIRE

Pharmacien, Licencié ès-sciences, Chargé des fonctions de Chef des Travaux de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Alger

Né le 28 Mai 1921 à BASSE-POINTE (Martinique)

Membres du Jury

MM. GIBERTON, *Professeur de Chimie Biologique et Médicale* — *Président*
MONNET, *Professeur de Pharmacie* — Juges
GRANGAUD, *Maître de Conférences Agrégé de Chimie Médicale* — Juges
GUILLEMONAT, *Maître de Conférences des Facultés des Sciences* — Juges

Librairie LE FRANÇOIS
91, Boulevard St-Germain, PARIS

1950

UNIVERSITÉ D'ALGER
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1950 — N° 5

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE D'UN CONSTITUANT DU LIÈGE : L'ACIDE PHLOÏONIQUE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

présentée et soutenue publiquement le 26 JUIN 1950

PAR

Olivier Georges CÉSAIRE

Pharmacien, Licencié ès-sciences, Chargé des fonctions de Chef des Travaux de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie d'Alger

Né le 28 Mai 1921 à BASSE-POINTE (Martinique)

Membres du Jury

MM. GIBERTON, *Professeur de Chimie Biologique et Médicale* — *Président*
MONNET, *Professeur de Pharmacie* — Juges
GRANGAUD, *Maître de Conférences Agrégé de Chimie Médicale* — Juges
GUILLEMONAT, *Maître de Conférences des Facultés des Sciences* — Juges

Librairie LE FRANÇOIS
91, Boulevard St-Germain, PARIS

1950

UNIVERSITÉ D'ALGER

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE D'ALGER

Doyen	MM. SARROUY (✲, ⚷, ⚸, A. ⚙).
	LEBLANC (✲, ⚸, I. ⚙).
	GILLOT (I. ⚙).
Doyen honoraire	MUSSO (✲, I. ⚙).
	LAFFONT (O. ✲, ⚸, I. ⚙, o.s.).
	LEBON (C. ✲, ⚸, I. ⚙).
Assesseur	GIBERTON (I. ⚙).

PROFESSEURS

Clinique médicale	MM. AUBRY (O. ✲, ⚸, I. ⚙).
Clinique des maladies infectieuses	BENHAMOU (C. ✲, ⚸, I. ⚙).
Clinique chirurgicale	COSTANTINI (O. ✲, ⚸, I. ⚙).
Pathologie chirurgicale	DUBOUCHER Henri (I. ⚙).
Bactériologie	FABIANI.
Matière médicale	FOURMENT (✲, I. ⚙, ⚷).
Chimie biologique et médicale	GIBERTON (I. ⚙).
Clinique de dermato-syphiligraphie	HADIDA (⚸).
Histologie et Embryologie	KEHL (A. ⚙).
Hygiène, Hydrologie et gynécologique	LACROIX (⚸, I. ⚙).
Clinique obstétricale et gynécologique	LAFFONT (O. ✲, ⚸, I. ⚙, o.s.).
Clinique thérapeutique médicale	LEBON (C. ✲, ⚸, I. ⚙).
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	LOMBARD (✲, ⚸, I. ⚙).
Physiologie	MALMEJAC (✲, I. ⚙).
Clinique neuro-psychiatrique	MANCEAUX (✲, ⚸).
Parasitologie et zoologie médicale	MANDOUL.
Pharmacie	MONNET (A. ⚙).
Anatomie pathologique et encologie humaine et comparée	MONTPELLIER (✲, I. ⚙).
Physique médicale	PORTES (O. ✲, ⚸, I. ⚙).
Pathologie générale et médicale	RAYNAUD Robert (⚸).
Anatomie	RIBET (de) (✲, ⚸, I. ⚙).
Botanique	ROQUES (I. ⚙).
Clinique urologique	SABADINI (✲, I. ⚙).
Clinique médicale et hygiène infantile	SARROUY (✲, ⚷, ⚸, A. ⚙).
Médecine légale et médecine du travail	THIODET (✲, ⚸, A. ⚙).
Clinique ophtalmologique et ophtalmologie intertropicale	TOULANT (O. ✲, ⚸, I. ⚙).
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	WUNSCHENDORFF (I. ⚙).
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	N...
Phtisiologie	LEVI VALENSI (✲, ⚸).

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. BENOIT (⚙).
CABANES.
COURRIER (✲, ⚸, I. ⚙).
GILLOT (I. ⚙).
MM. LEBLANC (✲, ⚸, I. ⚙).
MUSSO (✲, I. ⚙).
POROT (I. ⚙).
WEBER (I. ⚙).

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. HOUEL (✲, ⚸, I. ⚙). Agrégé pérennisé (obstétrique).

MAITRES DES CONFERENCES AGREGES

Physiologie	MM. CHARDON.
Physique médicale	CHECHAN (I. ✠).
Pharmacie	COLLET.
Chimie médicale	GRANGAUD (A. ✠).

AGREGES

Chirurgie	MM. GOINARD (A. ✠). LIARAS. VERGOZ (✠).
Dermato-syphiligraphie	N...
Accouchement	JAHIER (A. ✠).
Anatomie pathologique	LAFFARGUE.
Médecine	BOULARD. FABREGOULE.
Pédiatrie	COMBE.
Bactériologie	N...
Histologie et embryologie	N...
Anatomie	BOURGEON.
Médecine légale	MICHAUX.
Histoire naturelle pharmaceutique	N...
Chimie générale pharmaceutique et toxicologie	N...
Oto-rhino-laryngologie	GIRAUD.
Odonto-stomatologie	N...
Neuro-psychiatrie	SUTTER.
Ophtalmologie	LARMANDE.

AGREGES LIBRES

Physiologie	M. BATTEZ.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41542710_0065

A LA MEMOIRE DE MA GRAND-MERE

A MON PERE

A MA MERE

A MES FRERES

A MES SŒURS

A MES AMIS

A MADEMOISELLE MASSONET

Assistante au Laboratoire de Chimie biologique et médicale

Dont le dévouement à la vie collective du service est d'un tel prix pour chacun de ceux qui y ont part.

Hommage de profonde et respectueuse sympathie.

A MES CAMARADES DE LABORATOIRE

A Monsieur SABON

Chef des Travaux à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux

Qui nous initia aux techniques de la chimie analytique.

Témoignage de vive sympathie et de profonde reconnaissance.

A NOTRE CONDISCIPLE Henri GRIGNON

Pharmacien des Hôpitaux

Dont l'amitié nous est si précieuse.

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE D'ALGER

A NOS MAITRES
DE LA FACULTE DES SCIENCES D'ALGER

A NOS JUGES :

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur GIBERTON

Professeur de Chimie biologique et médicale
à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

A qui nous devons notre formation scientifique et notre initiation à la recherche. Nous ne saurions assez dire combien, au cours des sept années passées à ses côtés, nous avons apprécié la qualité de son enseignement, l'étendue de son érudition et, plus encore, le réconfort des marques de confiance et d'affectueuse sympathie dont il nous honore.

Hommage de profonde gratitude et de respectueuse admiration.

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur MONNET

Professeur de Pharmacie à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Nous n'oublierons pas la bienveillance avec laquelle, dès notre arrivée à Alger, il nous a accueilli dans son service. Les encouragements et les conseils qu'il n'a cessé de nous prodiguer ont grandement contribué à notre formation.

Pour la sympathie dont il veut bien nous honorer, nous le prions de trouver ici l'expression de notre profonde et respectueuse gratitude.

A NOTRE MAITRE

Monsieur le Professeur Agrégé GRANGAUD

Maître de conférences à la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Qui, tout au cours de ce travail, malgré le temps qu'il consacre à la recherche et à l'enseignement, nous a fait bénéficier, avec sa coutumière affabilité, de sa grande expérience de biochimiste et de ses qualités d'analyste.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueux et fidèle attachement.

A Monsieur A. GUILLEMONAT

Maître de conférences des Facultés des Sciences

Qui a bien voulu nous associer à ses travaux sur le liège et qui, avec une inlassable amabilité, a assuré la direction de la partie chimique de ces recherches.

Nous ne saurions exprimer la joie des heures de travail pasées auprès de lui, et l'enrichissement que ses qualités de chercheur nous ont prodigué.

PREFACE

Malgré le nombre des travaux consacrés à l'étude du liège, nos connaissances sur les différents constituants de ce tissu, pourtant si répandu dans le règne végétal, sont encore très sommaires.

Les différents chercheurs qui se sont occupés de cette question [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9] se sont attachés surtout à l'étude du liège produit par le *Quercus suber*, et ils en ont extrait, outre la cellulose et une lignine, des produits d'aspect cireux — céroïdes — des substances apparentées aux tanins, des substances azotées, et tout un groupe d'acides organiques formant ce que l'on appelle habituellement la subérine. Parmi ceux-ci, certains qu'on trouve en très petite quantité dans le liège, comme les acides arachidique, oléique, linoléique, existent également dans les matières grasses usuelles ; d'autres, qui forment la majeure partie de la subérine, comme les acides phellonique, phloïonique, phellogénique, phloïnolique, etc..., sont des constituants dont on n'a montré jusqu'ici l'existence que dans le liège.

Le chêne-liège étant très répandu en Afrique du Nord, il nous a semblé intéressant d'approfondir l'étude d'un de ces acides, l'acide phloïonique, pratiquement le seul dont l'individualité chimique et la constitution ne soient plus discutées.

L'objet du présent travail est donc de préciser la préparation pratique à partir du liège de l'acide phloïonique, et de déterminer quelques aspects de ses comportements chimique et biochimique.

Ce travail a été exécuté au laboratoire de Chimie

biologique de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie d'Alger.

Nous prions M. le Professeur Giberton, qui le dirige, de bien vouloir trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude, non seulement pour la peine qu'il a prise à l'élaboration de cette thèse, mais encore pour l'affectueuse sollicitude dont il n'a cessé de nous entourer depuis notre entrée dans son service.

Que notre maître nous permette d'associer dans un même sentiment de reconnaissance ceux qui travaillent à ses côtés : M. Guillemonat, maître de conférences des Facultés des Sciences, qui, au cours de ces recherches, nous a fait profiter de son expérience de chimiste organicien, M. le Docteur Grangaud, maître de conférences agrégé, dont les conseils nous ont été si précieux.

INTRODUCTION

L'acide phloïonique est l'octodécane diol 9-10 dioïque :

$$HO\diagdown\!\!\diagup O > C - (CH^2)\overset{7}{-} CHOH - CHOH\ (CH^2)\overset{7}{-} C < \diagup\!\!\diagdown O\diagdown H$$

C'est un corps solide, blanc, cristallisé, soluble dans l'alcool, l'acétone, l'acétate d'éthyle, peu soluble dans l'éther et dans l'eau.

On trouve déjà le nom d'acide phloïonique dans les premiers travaux sur la constitution chimique du liège, mais il ne semble pas avoir été appliqué à un produit bien défini ; Gilson [6] lui attribuait la formule $C^{11}\ H^{22}\ O^3$; Scurti et Tammasi [10] le considéraient comme un acide tricarboxylique en C^{25}.

C'est à Zetzsche [11, 12] que revient le mérite d'avoir préparé pour la première fois de l'acide phloïonique pur, d'en avoir précisé les principales constantes physiques, et établi la constitution de façon certaine.

La meilleure méthode de préparation de l'acide phloïonique, pratiquement la seule permettant de l'obtenir à l'état pur, était jusqu'à présent celle de Zetzsche [11], qui conduit au rendement très faible de 0,1 g. p. 100.

Cette méthode comporte une suite d'opérations longues et compliquées au cours desquelles on pouvait penser qu'une grande partie du produit était perdue ; nous étions donc en droit de rechercher une méthode de préparation donnant un meilleur rendement.

M. A. Guillemonat ayant bien voulu nous indiquer le principe d'une préparation commode de l'acide phloïoni-

que, nous avons pu mettre au point, sous sa direction, un mode d'extraction plus rapide et fournissant un rendement huit fois supérieur à celui de Zetzsche.

Nous avons ainsi obtenu des quantités assez importantes d'acide phloïonique qui nous ont permis non seulement d'apporter une contribution à l'étude chimique de ce corps, mais aussi d'entreprendre avec lui un certain nombre d'expériences biologiques.

Notre travail sera donc divisé en deux parties : une première partie consacrée à la chimie de l'acide phloïonique, une deuxième partie dans laquelle nous apportons une contribution expérimentale à l'étude du comportement biologique de l'acide phloïonique.

PARTIE CHIMIQUE

CONSTITUTION DE L'ACIDE PHLOIONIQUE

Ainsi que nous l'avons indiqué, c'est Zetzsche [12] qui a établi la constitution de l'acide phloïonique.

L'acide phloïonique répond à la formule brute $C^{18}\ H^{34}\ O^{6}$; l'analyse de son ester méthylique et la détermination de son indice d'acidité montrent qu'il s'agit d'un acide dicarboxylique.

L'oxydation par le tétracétate de plomb indique de plus que c'est un α-glycol. On sait en effet que l'oxydation par le tétracétate de plomb des glycols α-secondaires, les scinde en deux fonctions aldéhydiques, et cela avec d'excellents rendements [13] ; or cette réaction appliquée par Zetzsche à l'acide phloïonique lui a donné avec un rendement de 82 p. 100 l'acide nonanalique

$$HO\!>\!\overset{O}{C} - (CH^{2})^{7} - C\!<\!\overset{O}{H}$$

qui par oxydation ultérieure conduit à l'acide azélaïque ; ceci montre l'existence de la fonction glycol α-secondaire dans l'acide phloïonique.

Le fait que l'on n'obtienne qu'une seule fraction aldéhydique indique que la molécule est symétrique.

Ceci fixe la constitution de l'acide phloïonique :

$$HO\!>\!\overset{O}{C} - (CH^{2})^{7} - CHOH - CHOH - (CH^{2})^{7} - C\!<\!\overset{O}{OH}$$

qui est l'octodécane diol 9-10 dioïque.

PREPARATION DE L'ACIDE PHLOIONIQUE

I. — METHODE DE ZETZSCHE ET SONDEREGGER [11]

Zetzsche avait essentiellement en vue l'étude des différents constituants du liège ; son extraction de l'acide phloïonique du liège n'est qu'une des phases d'un procédé d'analyse immédiate tendant à la séparation des différents constituants du liège.

Nous limiterons donc l'exposé de ce procédé aux opérations concernant l'obtention de l'acide phloïonique.

1° *Elimination des tanins et des cires.*

On fait bouillir pendant deux heures 1.250 grammes de liège pulvérisé dans 15 litres de solution de sulfite de sodium à 4 p. 100 ; on filtre à chaud et traite l'insoluble de la même façon, d'abord par 15 litres de solution de sulfite de sodium à 2 p. 100, puis par quatre fois 15 litres d'eau.

Le traitement du liège par le sulfite a pour but d'éliminer des substances gênantes telles que les tanins, les cires, etc..., et de fournir un matériel plus commode à travailler et déjà purifié.

Le liège sulfité est alors lavé avec sept litres d'alcool qu'on sépare par filtration après douze heures de repos, et on l'épuise encore en le faisant bouillir avec trente litres d'alcool employés en trois fois ; on filtre pour éliminer la solution alcoolique.

2° *Saponification.*

On fait bouillir la moitié du liège ainsi préparé avec cinq litres d'alcool sodé à 5 p. 100 ; après deux heures d'ébullition, on ajoute l'autre moitié délayée dans un litre d'alcool et on maintient l'ébullition deux heures de plus. L'alcool est séparé par filtration à chaud, et le résidu est de nouveau traité à l'ébullition pendant quatre heures par 3,5 litres d'alcool contenant 150 g. de soude. Après filtration, on épuise encore à chaud le résidu insoluble par six litres d'alcool employés en trois fois.

On sature d'anhydride carbonique les filtrats alcooliques mélangés, on porte à l'ébullition et on filtre pour séparer le carbonate de sodium ; le filtrat par évaporation sous vide du solvant donne les sels de sodium des acides gras du liège.

3° *Séparation des acides gras du liège.*

Les sels de sodium des acides gras du liège dissous dans cinq litres d'eau sont traités à chaud par un litre de solution de chlorure de sodium à 3 p. 100 ; on filtre et on laisse reposer douze heures ; au bout de ce temps, on filtre à nouveau pour séparer le phellonate de sodium qui s'est déposé.

Le filtrat est acidifié à l'acide chlorhydrique, qui précipite les acides organiques insolubles ; ceux-ci sont extraits à l'éther ; on sèche le solvant sur sulfate de sodium anhydre et, après l'avoir éliminé, on obtient 255 grammes de résidu huileux.

A cette huile, dissoute dans 1,50 litre d'alcool chaud, on ajoute 200 grammes d'acétate de plomb en suspension dans un litre d'alcool ; il se forme un précipité qu'on sépare.

Les sels de plomb insolubles sont lavés à l'alcool, puis agités avec de l'éther en présence d'acide chlorhydrique étendu ; on sépare l'éther, le lave à l'eau et conserve cette eau de lavage pour un traitement ultérieur ; on sèche

l'éther sur sulfate de sodium anhydre ; ce solvant évaporé laisse 85 grammes d'un extrait huileux qui se solidifie peu à peu (fraction L).

On filtre les eaux de lavage séparées de l'éther pour éliminer les sels de plomb insolubles ; ceux-ci sont lavés à l'alcool ; ce solvant évaporé laisse un résidu huileux qu'on fait cristalliser dans l'éthanol à 10 p. 100 ; après décoloration au charbon, on obtient ainsi 0,50 gramme d'acide phloïonique cristallisé.

La fraction L est remise en solution dans deux litres d'alcool à 10 p. 100 ; on filtre, et dans le filtrat, au bout d'un certain temps, se déposent des cristaux d'acide phloïonique souillés d'une huile brune. On purifie l'acide par décoloration au charbon dans l'éthanol à 10 p. 100 et cristallisation dans ce solvant.

On obtient ainsi 5,5 grammes d'acide phloïonique brut fondant à 121°.

TABLEAU RÉSUMANT L'EXTRACTION DE L'ACIDE PHLOÏONIQUE PAR LA MÉTHODE DE ZETZSCHE ET SONDEREGGER

Liège 1.250 grammes
↓ $Na^2 SO^3$
Résidu lavé à l'eau puis à l'alcool
↓ Na OH alcoolique
Solution alcoolique des savons des acides gras du liège
↓ CO^2. Filtration
↓ Distillation du filtrat
Sels de Na des acides gras du liège redissous dans H^2O
↓ Na Cl en solution
de phellonate de Na
↓ filtration
Filtrat
↓ + H Cl
d'acides organiques
↓ épuisement à l'éther
↓ et évaporation du solvant
255 g. de résidu huileux
↓ Pb $(CH^3 CO^2)^2$
↓ + alcool
Sels de plomb insolubles
↓ H Cl
↓ + éther
Solution éthérée lavée à l'eau

Eaux de lavage
↓ filtration
Sels de Pb insolubles
↓ lavage à l'alcool
Solution alcoolique
↓ distillation alcool
↓ et recristallisation
0,50 g. d'acide phloïonique cristal.

Sol. éthérée des acides dont le sel de Pb est insoluble dans l'alcool
↓ évaporation solvant
8 5 g. fraction L
↓ décoloration au charbon et cristallisation dans l'alcool
5,5 g. d'acide phloïonique crist.

Cette méthode de préparation longue, compliquée, exigeant des volumes considérables de solvants organiques et de nombreuses manipulations, fournit moins de 5 grammes d'acide phloïonique par kilog de liège. Ce faible rendement s'explique par le fait que le traitement du liège au sulfite de sodium en élimine une grande partie des acides gras [11], en même temps que les cires et les tanins ; de plus, l'acide phloïonique étant peu soluble dans l'éther, il ne semble pas intéressant de le préparer à partir d'un extrait éthéré comme le fait Zetzsche.

Ainsi que nous venons de le rappeler, l'un des premiers buts de ce travail a été de simplifier la méthode de préparation indiquée par Zetzsche en l'adaptant à l'obtention de l'acide phloïonique seul, tout en essayant d'en améliorer le rendement.

II. — METHODE DE A. GUILLEMONAT ET G. CESAIRE [14]

Sous la direction de M. A. Guillemonat, nous avons pu mettre au point un mode d'extraction qui est non seulement plus rapide que celle décrite plus haut, mais encore a l'avantage d'avoir un rendement sept à huit fois supérieur ; la teneur du liège en acide phloïonique est donc au moins de trois p. 100.

Principe de la méthode.

Le principe de cette méthode consiste à utiliser le solubilité dans l'eau du sel de calcium de l'acide phloïonique, propriété déjà signalée par Guillemonat [15].

Le liège est d'abord traité par la soude, de manière à dépolymériser la subérine. Ensuite on peut :

1° Soit libérer les acides gras du liège par un acide

minéral et traiter l'ensemble du produit par un lait de chaux ;

2° Soit précipiter les acides gras de la subérine par un sel de calcium.

Dans l'un et l'autre cas, une filtration fournit une solution de sel de calcium de l'acide phloïonique avec peu d'impuretés.

Nous avons également songé à utiliser la solubilité dans l'eau du sel de magnésium de l'acide phloïonique, mais la filtration de la solution est très difficile et le produit obtenu moins pur.

L'acide phloïonique brut obtenu par acidification de la solution de son sel de calcium est purifié par cristallisation dans l'acide acétique dilué, et dans l'acétone à 10 % d'acide acétique.

Technique de la préparation.

On laisse en contact, à froid, pendant quatre à cinq jours, en agitant une fois par jour.

Liège en poudre	3 kg.
Soude	0,750 kg.
Eau	40 litres

Au bout de ce temps, la masse est devenue assez fluide. On acidifie avec 1 kg. d'acide sulfurique à 65° B. La couleur passe du brun chocolat au brun clair. On ajoute 1 kg. de chaux vive et porte à l'ébullition, que l'on maintient une heure. Après filtration à chaud sur papier, on recueille environ 30 litres de filtrat peu coloré ; le produit restant sur le filtre est repris par 30 litres d'eau bouillante. On a donc au total 60 litres de filtrat qu'on acidifie à l'acide sulfurique. Au bout de six heures, le précipité d'acide phloïonique a décanté au fond du récipient. On siphonne la majeure partie du liquide et essore sous vide le précipité.

Ce dernier est dissous à chaud dans de l'acide acétique à 50 p. 100 et filtré à chaud sous vide ; l'acide phloïonique

cristallise à froid. On cristallise à nouveau dans le même solvant, puis on traite à chaud par du charbon dans de l'acétone contenant 10 p. 100 d'acide acétique ; par refroidissement on obtient des cristaux blancs d'acide phloïonique avec un rendement de 30 grammes par kilog de liège.

L'acide que nous avons préparé par le procédé ci-dessus présente les mêmes caractères que l'acide phloïonique obtenu par Zetzsche : il fond à 124° (bloc de Maquenne) et son analyse élémentaire donne les résultats suivants :

C p. 100	trouvé 62,49 et 62,41	Théorie 62,42
H p. 100	trouvé 10,69 et 9,67	Théorie 9,82

PROPRIETES DE L'ACIDE PHLOIONIQUE

Sans faire dans ce chapitre une étude chimique complète de l'acide phloïonique, nous insisterons surtout sur celles des propriétés permettant non seulement de le préparer à partir du liège, mais aussi de l'extraire, l'isoler à l'état pur et l'identifier à partir de milieux biologiques complexes comme la peau, les muscles, les viscères, etc...

Zetzsche, qui est le seul à avoir isolé l'acide phloïonique à l'état pur, ne donne que peu de renseignements sur ses propriétés ; l'auteur s'est borné à rechercher celles qui étaient de nature à lui permettre d'en déterminer la constitution ; nous avons donc jugé utile d'apporter quelques précisions sur les propriétés chimiques de l'acide phloïonique et de quelques-uns de ses dérivés.

Propriétés physiques.

L'acide phloïonique se présente en cristaux blancs, transparents, anhydres, inodores, insipides, faciles à pulvériser ; il fond à 124° (bloc de Maquenne) sans décomposition ; il est plus dense que l'eau : si, dans un tube à

essais contenant 5 centimètres cubes d'eau distillée, on projette quelques centigrammes d'acide phloïonique, on constate que celui-ci reste longtemps dans l'eau en formant des flocons nuageux qui précipiteront finalement au fond du tube ; mais la précipitation demande souvent des jours pour être complète, fait probablement lié à la lenteur de l'imbibition.

Soluble dans l'acide acétique, l'acétate d'éthyle, l'alcool, l'acétone, l'acide phloïonique est peu soluble dans l'eau bouillante (2 à 3 g. par litre), dans l'éther, le benzène, les solvants dérivés du pétrole et les solvants chlorés ; sa solubilité dans l'eau distillée à la température ordinaire n'est que de 0,25 g. par litre ; il est insoluble dans les glycérides et les graisses naturelles.

L'acide phloïonique est inactif sur la lumière polarisée ; il est inaltérable à l'air et à la lumière.

Par chauffage au-dessus de son point de fusion, et même à une température inférieure s'il contient des traces d'acide minéral, l'acide phloïonique se transforme en une masse infusible et insoluble dans les solvants usuels ; il est probable que c'est sous cette forme ou sous une forme analogue qu'il existe dans le liège ; par traitement à la soude suivi d'une acidification, on régénère l'acide phloïonique de son produit de condensation ; ce produit est donc vraisemblablement un « étholide », c'est-à-dire un polyester de poids moléculaire élevé.

Propriétés chimiques.

Les phloïonates de sodium et de potassium sont très solubles dans l'eau et leurs solutions moussent abondamment ; ces savons restent en solution même en présence de chlorure de sodium à saturation ; cette propriété peut servir à la séparation de l'acide phloïonique d'un mélange d'acides gras.

Le phloïonate de calcium est soluble dans l'eau à raison de 2,2 g. par litre à la température ordinaire.

On peut préparer le phloïonate de magnésium en

mélangeant l'acide et l'oxyde de magnésium en relations stoechiométriques ; on ajoute cinquante parties d'eau et on porte au bain-marie pendant une demi-heure ; on filtre à 20° ; le filtrat évaporé laisse un résidu contenant 6,62 p. 100 de magnésium qui correspond au sel neutre ; nous avons obtenu également le phloïonate de magnésium en agitant à froid l'acide phloïonique avec une suspension d'oxyde de magnésium dans l'eau ; on filtre ensuite : le filtrat mousse et par acidification par l'acide sulfurique, laisse reprécipiter l'acide phloïonique. Le phloïonate de magnésium est soluble dans l'eau à 20° à raison de 9,5 g. par litre : sa solubilité est beaucoup plus grande à chaud.

L'ester diméthylique de l'acide phloïonique fond à 77° ; nous le préparons en faisant bouillir à reflux pendant une heure l'acide phloïonique dans trois fois son poids d'alcool méthylique en présence d'une petite quantité d'acide sulfurique ; après neutralisation par une solution de carbonate de sodium qui élimine l'acide phloïonique non combiné, l'alcool est chassé au bain-marie ; on lave l'ester et le fait cristalliser dans l'alcool méthylique étendu.

Avec l'acétone, l'acide phloïonique donne aisément, en présence d'une trace d'acide minéral, un acétal liquide soluble dans l'éther ; la facilité de préparation de l'acétal indique que l'acide phloïonique utilisé par nous est probablement l'isomère inactif par nature, indédoublable.

Acétylation.

Nous avons constaté que le procédé classique de détermination de l'indice d'acétyle selon Emile André [16] est difficilement applicable dans le cas de l'acide phloïonique. Dans la méthode d'Emile André, en effet, après avoir effectué à 100° l'acétylation par l'anhydride acétique, on chasse l'excès de ce réactif bouillant à 135-137° en présence de xylol bouillant à la même température, qui favorise l'entraînement. En fait, il est pratiquement impossible, à la pression atmosphérique, d'éliminer la majeure partie

de l'anhydride acétique non combiné sans élever la température du bain où plonge le ballon-laboratoire vers 175 à 180° ; or le dérivé acétylé de l'acide phloïonique se décompose à cette température, et la méthode se trouve en défaut.

Nous avons cherché à éviter cet inconvénient en modifiant l'appareillage d'Emile André, et nous avons finalement adopté la technique suivante, qui repose sur le même principe que la méthode d'Emile André, dont elle n'est que l'adaptation à l'échelle microanalytique. Cette technique présente de plus l'avantage de n'exiger qu'une petite quantité de matière première et de réactifs.

Nouvelle technique de détermination de l'indice d'acétyle [17].

Dans un tube à centrifuger en verre « pyrex » de 15 cm³ de capacité, on pèse un poids p d'acide phloïonique (40 à 50 milligrammes) ; on y ajoute 0,25 cm³ d'anhydride acétique récemment distillé, bouillant à 135-137°, et 1 cm³ de xylol bouillant également à 135-137°. On adapte au tube un bouchon traversé par un long tube de verre servant de réfrigérant. L'acétylation s'effectue au bain-marie à 100° pendant une heure. On chasse ensuite l'anhydride en excès en enlevant le réfrigérant et en plongeant le tube jusqu'aux trois quarts de sa longueur dans un bain de paraffine qu'on porte à 150°. Après refroidissement, on ajoute 1 cm³ de xylol qu'on chasse à nouveau par chauffage à 150° ; on fait un troisième entraînement à la vapeur de xylol dans les mêmes conditions.

On détermine alors l'indice de saponification du produit acétylé en opérant comme suit : on verse 1 cm³ de potasse alcoolique sensiblement normale correspondant à V cm³ d'acide sulfurique décinormal, on complète à 2 cm³ avec de l'alcool à 90° et on chauffe au réfrigérant à reflux pendant une heure à la température du bain-marie bouillant. Il faut prendre soin ici d'employer un tube-réfrigérant autre que celui qui a servi à l'acétylation.

Après refroidissement, on titre la potasse en excès par l'acide sulfurique décinormal en présence de phénolphtaléine. Soit V' le volume d'acide utilisé.

L'indice de saponification de l'acide Phloïonique acétylé est calculé de la façon suivante :

$$S = \frac{(V-V').\ 5,6}{p}$$

p étant exprimé en grammes.

On détermine d'autre part l'indice d'acidité (1) A de l'acide phloïonique, et on en tire l'indice d'acétyle d'après la formule :

$$I\ ac = (S - A).\ \frac{60}{56} = (S - A).\ 1,071$$

l'indice d'acétyle étant le nombre de milligrammes d'acide acétique que peut fixer 1 gramme de substance par estérification de ses fonctions alcool libres. (E. André).

Justification de la microméthode.

Nous avons éprouvé cette technique sur le cholestérol, monoalcool de poids moléculaire 386,64 dont l'indice est 155.2. Le matériel et les opérations sont les mêmes que pour l'acide phloïonique ; mais le cholestérol ne possédant pas de fonction acide, il est inutile d'en déterminer l'indice d'acidité.

Résultats obtenus avec le cholestérol

Pesée	*Indice trouvé*	*Indice théorique*
75 mmg.	148	155,2
80 »	148	»
74 »	150	»
84 »	151	»
70 »	155	»

(1) L'indice d'acidité est le nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour saturer les acides gras contenus dans 1 gramme de corps gras.

Ces résultats, qui s'écartent de moins de 5 p. 100 de la théorie, sont satisfaisants et justifient la microméthode utilisée.

Application à l'acide phloïonique.

En utilisant la technique qui vient d'être décrite, nous avons effectué des déterminations d'indice d'acétyle sur des échantillons d'acide phloïonique. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Pesée	*Indice trouvé*	*Indice théorique*	
		calculé pour l'acétylation des deux hydroxyles	calculé pour l'acétylation d'un seul hydroxyle
41 mmg.	173	346,80	173,40
38 »	172		
36 »	174		
48 »	171		
58 »	174		
52 »	173		
Moyenne	172,9		

L'examen des résultats fait apparaître que l'indice obtenu correspond au produit monoacétylé. Tout s'est donc passé comme si une seule des deux fonctions alcool de l'acide phloïonique avait fixé un groupement acétyle, ce qui n'a rien de surprenant puisqu'il s'agit d'un α-glycol.

Nous nous sommes cependant demandé si le produit formé était bien d'emblée le dérivé monoacétylé, ou si le produit final ne résultait pas de la décomposition partielle — sous l'action du chauffage à 150° — du dérivé diacétylé.

Pour trancher la question, nous avons déterminé l'indice d'acétyle de l'acide phloïonique par la méthode de Delaby [18].

Dans cette méthode, l'acétylation s'effectue à 100° par l'anhydride acétique employé en excès, et on titre en

retour l'anhydride resté libre après l'avoir transformé en acide ; une opération à blanc permet de calculer la quantité d'acide acétique fixée par la substance analysée.

Les résultats que nous avons enregistrés avec la méthode de Delaby confirment que l'acétylation de l'acide phloïonique porte bien sur un seul de ses deux hydroxyles ; ils soulignent en même temps que les déterminations d'indice d'acétyle effectuées sur des graisses renfermant des acides gras comportant deux hydroxyles en position α l'un par rapport à l'autre, conduisent à des valeurs plus basses que celles calculées d'après le nombre total des hydroxyles présents.

Il convient donc d'être prudent dans l'interprétation des résultats obtenus sur les mélanges complexes.

Préparation d'un glycéride de l'acide phloïonique.

Nous avons d'abord essayé de combiner directement l'acide phloïonique au glycérol, mais, comme il fallait s'y attendre, nous avons obtenu des polyesters de poids moléculaire élevé d'aspect résineux.

Nous avons alors utilisé la technique suivante [19].

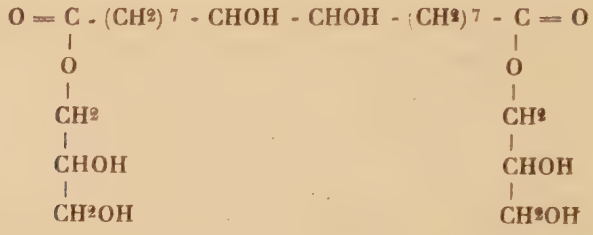
On fait réagir à chaud, sous pression réduite, le phloïonate de méthyle sur le glycérol en présence d'une petite quantité de soude caustique, et on élimine l'alcool méthylique déplacé par le glycérol au fur et à mesure de sa formation. En fin de réaction, il ne reste plus d'alcool méthylique, et il suffit de laver le résidu à l'eau pour enlever le glycérol en excès et la soude.

En appliquant cette technique, nous avons obtenu un corps blanc, translucide, amorphe, fondant vers 60°, dont l'indice de saponification était de 228. Il répondait à la composition suivante :

C p 100	60,48
H p 100	8,98

(Moyenne de trois analyses).

Cette analyse est assez éloignée de la composition du diester glycérique de l'acide phloïonique.



C p 100 58,4
H p 100 9,31

Indice de saponification théorique : 227.

Il semble donc qu'il se soit formé des corps plus complexes résultant de la réaction d'autres molécules d'ester méthylique de l'acide phloïonique sur une ou plusieurs des fonctions alcool libres du diester glycérique précédent. L'indice de saponification est peu significatif, car bien des combinaisons de structure différente peuvent se traduire par une même valeur de l'indice : on sait en effet que cet indice dépend essentiellement de la longueur de la chaîne carbonée des acides gras.

L'étude chimique d'un mélange aussi complexe sortait des limites de notre travail, notre but ayant été seulement de préparer un dérivé de l'acide phloïonique d'un point de fusion moins élevé que l'acide lui-même, ceci dans l'espoir de disposer d'une substance dont l'absorption intestinale serait meilleure que l'acide lui-même ou que ses sels.

CONCLUSION A LA PARTIE CHIMIQUE

Nous avons extrait du liège un acide gras, l'acide phloïonique, en utilisant une méthode de préparation différente de celle indiquée par Zetzsche.

Cette méthode simple, relativement rapide, fournit un rendement de 30 g. d'acide par kilog de liège, 8 fois supérieur à celui qu'obtient Zetzsche.

Le rendement ainsi obtenu montre que l'acide phloïonique entre sans doute sous forme de polyesters pour 3 à 4 p. 100 dans la constitution chimique du liège. Il constitue donc une partie non négligeable de la subérine du liège.

Les caractères chimiques de l'acide phloïonique sont ceux d'un diacide-dialcool qui ne fournit à l'acétylation qu'un dérivé monoacétylé, propriété due au fait que les hydroxyles sont situés en α l'un par rapport à l'autre.

PARTIE BIOCHIMIQUE

PARTIE BIOCHIMIQUE

L'acide phloïonique étant suffisamment apparenté aux acides gras des graisses animales et cependant assez différent par ses propriétés physiques et chimiques, il était concevable de tenter son utilisation comme substance traceuse pour étudier le mouvement des graisses dans l'organisme d'animaux de laboratoire. Cette dernière question ayant fait l'objet de travaux aujourd'hui classiques fondés sur l'utilisation d'acides gras marqués par le deutérium, il nous a semblé vain de reprendre l'étude d'un tel problème au moyen de l'acide phloïonique.

L'acide phloïonique, par son caractère de diacide et de par ses deux fonctions alcool en 9-10, diffère notablement des acides gras des graisses animales. Cependant, après avoir nourri des rats pendant plusieurs semaines au moyen d'un régime contenant de l'acide phloïonique, nous avons pu déceler une petite quantité de cet acide dans le tissu adipeux et dans les viscères de ces animaux. Il est donc incontestable que l'acide phloïonique peut être incorporé aux tissus animaux. Présente-t-il le caractère de principe nutritif énergétique ? Du point de vue pratique, cette question n'offre pas d'intérêt. En effet, l'acide phloïonique n'est présent dans le liège qu'à un taux de l'ordre de 3 p. 100, son extraction est relativement laborieuse, et enfin l'absorption intestinale de cet acide est faible.

Nous avons démontré que l'acide phloïonique peut devenir un constituant des tissus, mais quelle est sa destinée ?

Le catabolisme des diacides, depuis le terme en C^6 jusqu'aux termes en C^{16} et C^{18}, a été étudié par P.-E. Ver-

kade et ses collaborateurs (1) [20, 21], par R. Emmrich et I. Emmrich-Glaser [22], puis par K. Bernhard [23].

La conclusion qui se dégage de ces travaux est que l'utilisation métabolique des diacides de C^6 à C^{11} inclus est très médiocre ou même peut être nulle, au moins dans certains cas ; cette utilisation devient relativement bonne à partir du terme en C^{12} ; elle est pratiquement complète pour les termes en C^{16} et C^{18}, pourvu que la dose ingérée ne soit pas excessive.

La présence de deux fonctions alcool en 9-10 dans la molécule de l'acide phloïonique modifie-t-elle la marche de la dégradation de ce diacide en C^{18}, favorise-t-elle la coupure de la molécule en son milieu avec formation de deux molécules d'acide azélaïque ? C'est un problème dont l'intérêt ne nous a pas échappé, mais que nous n'avons pas pu résoudre, faute d'avoir trouvé un moyen convenable pour rendre absorbable par la voie digestive ou parentérale une dose d'acide phloïonique suffisante pour permettre de déceler dans l'urine la présence éventuelle de diacides. Des recherches complémentaires nous permettront peut-être de répondre à la question posée.

Les expériences décrites dans les pages qui vont suivre n'ont donc pas d'autre prétention que de montrer dans quelle mesure un organisme animal peut tolérer l'acide phloïonique. Une telle question n'est pas dénuée d'intérêt ; en effet, il se pourrait que des propriétés thérapeutiques soient reconnues un jour à l'acide phloïonique ou à l'un de ses dérivés.

Une très grande prudence s'impose lorsqu'il s'agit d'administrer pendant un temps prolongé une substance non physiologique, même dans le cas où cette substance présente une analogie de structure avec des constituants normaux. La possibilité de phénomènes d'antagonisme biochimique doit être aujourd'hui présente à l'esprit ; il

(1) Les acides dicarboxyliques en C 4 occupant une position tout à fait à part et très bien élucidée aujourd'hui, il ne peut en être question ici.

est impossible de porter un jugement a priori sur l'innocuité d'une substance voisine des constituants normaux des organismes animaux.

Les travaux de E.-E. Lockhart et ses collaborateurs [25] ont montré, précisément dans le cas d'un acide gras dihydroxylé en C^{18}, l'acide dihydroxy 9-10 stéarique, que l'introduction à dose suffisante d'un tel acide dans l'alimentation de rats est suivie après 20 à 30 jours de l'apparition d'une baisse de l'hémoglobine, d'une augmentation du temps de coagulation et d'un syndrome hémorragique entraînant la mort de la plupart des animaux en moins de 70 jours. Le syndrome observé rappelle celui de l'avitaminose K.

Nous avons institué successivement trois expériences au cours desquelles nous avons introduit l'acide phloïonique de diverses manières dans la nourriture de rats albinos, établi la courbe de croissance des animaux et ensuite recherché l'acide phloïonique dans les tissus.

La première expérience a été surtout une expérience d'orientation.

Avec la seconde expérience, nous avons abordé le point de vue quantitatif.

Au cours de la troisième expérience, des examens de sang ont été pratiqués ; aucune des constatations faites par E.-E. Lockhart à propos de l'acide dihydroxy 9-10 stéarique n'a été retrouvée.

Enfin, nous avons étudié le comportement de phloïonate de sodium à l'égard des hématies.

PREMIERE EXPERIENCE

Il s'agissait de nourrir des rats avec une ration comportant une certaine proportion d'acide phloïonique ou d'un de ses dérivés.

En raison du point de fusion élevé de l'acide phloïonique et de son insolubilité dans les graisses alimentaires, nous avons recherché un artifice destiné à faciliter l'absorption intestinale de cette substance. Pour éviter les inconvénients possibles de l'ingestion d'un savon alcalin, nous avons préféré incorporer l'acide phloïonique libre à la ration alimentaire des animaux : nous avons tout d'abord employé un procédé consistant à chauffer à 126° un mélange d'acide phloïonique et des acides gras de l'huile d'olive, de façon à obtenir la fusion des cristaux d'acide phloïonique au sein des acides gras déjà liquéfiés ; en laissant refroidir lentement et en agitant sans arrêt, on obtient ainsi une bonne dispersion, la préparation se présentant sous forme d'une masse butyreuse. Par la suite, pour préparer un mélange plus riche en acide phloïonique, nous avons seulement trituré à froid, au mortier, les acides gras de l'huile d'olive et l'acide phloïonique, de peur de polymériser celui-ci par un chauffage trop prolongé.

Les acides gras de l'huile d'olive étaient préparés suivant la méthode classique : on saponifie l'huile avec un excès de potasse alcoolique ; après élimination de l'alcool et dissolution des savons dans un grand volume d'eau, le traitement de la solution obtenue par un acide minéral libère de leurs sels les acides gras, qui viennent surnager en un gâteau qu'on lave soigneusement jusqu'à disparition de toute acidité minérale.

PROTOCOLE DE LA PREMIERE EXPERIENCE

Cette expérience, qui a duré 83 jours, a été divisée en deux parties : dans la première période, les rats ont reçu une ration comportant 2,2 p. 100 d'acide phloïonique, puis, ayant constaté qu'ils supportaient cette substance sans dommage apparent, nous les avons nourris avec un régime à 5,5 p. 100 d'acide phloïonique.

Dix rats blancs mâles d'un même élevage, âgés de 51 jours, pesant entre 35 et 37 grammes, ont été divisés en deux lots A et B.

Les animaux du lot A servant de témoins étaient nourris ad libitum avec le régime suivant :

Caséine	20 g.
Blé finement moulu	40 g.
Mélange salin d'Osborne et Mendel	4 g.
Levure de bière sèche	6 g.
Acides gras de l'huile d'olive	20 g.

Ceux du lot B, jusqu'au 54e jour, recevaient dans les mêmes conditions le régime suivant :

Caséine	20 g.
Blé finement moulu	40 g.
Mélange salin d'Osborne et Mendel	4 g.
Levure de bière sèche	6 g.
Acide phloïonique	2 g.
Acides gras de l'huile d'olive	18 g.

Dans ce régime, l'acide phloïonique représente 2,2 p. 100 de l'ensemble des constituants et 10 p. 100 des lipides totaux.

A partir du 54e jour, un mélange d'acides gras comportant 25 p. 100 d'acide phloïonique a été substitué aux 20 g. de la ration ci-dessus.

La nourriture était présentée sous forme d'une bouillie préparée comme suit :

On triture au mortier le mélange salin, la caséine, la levure et le blé ; on ajoute 300 grammes d'eau, et on fait bouillir une dizaine de minutes en agitant sans cesse à l'aide d'une baguette de verre ; on ajoute les acides gras en brassant la masse jusqu'à obtention d'une bouillie homogène.

Chacun des dix animaux recevait une dose quotidienne de 15 unités internationales de vitamine A et de 1,5 U.I. de vitamine D sous forme d'une goutte de solution huileuse. Les rats des deux lots étaient pesés une fois par semaine en vue de l'établissement de leur courbe de croissance.

RESULTATS

Nous donnons ci-dessous les courbes de croissance obtenues.

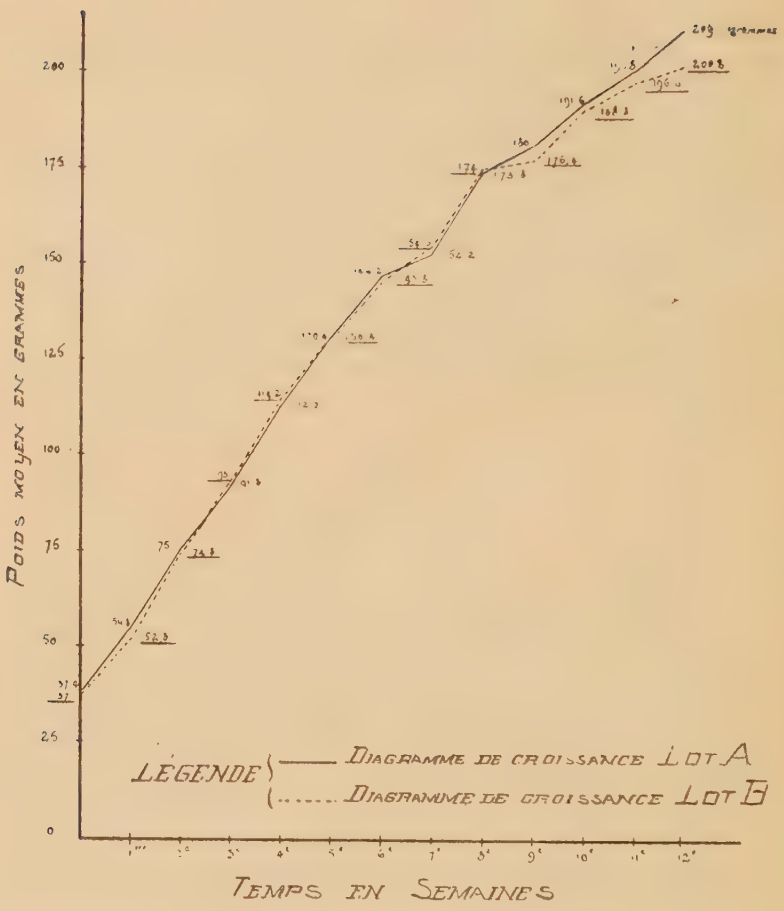
La courbe de croissance des témoins est normale, comme cela s'observe quand le régime est convenablement équilibré ; celle des animaux recevant l'acide phloïonique (lot B) lui est superposable jusqu'à la huitième semaine de l'expérience.

A partir de la huitième semaine, au moment où le régime des animaux du lot B comporte 5,5 p. 100 au lieu de 2,2 p. 100 d'acide phloïonique, les deux courbes restent encore superposables pendant trois semaines, puis la courbe des rats du lot B s'écarte de celle des témoins, montrant une vitesse de croissance légèrement diminuée.

Cette huitième semaine correspond aussi au moment où avait été modifié le mode de préparation du mélange d'acide phloïonique avec les acides gras de l'huile.

A la fin de l'expérience, la différence entre les poids moyens des deux lots d'animaux n'était que de 8 grammes.

Cette différence est-elle significative ?



Seule la prolongation de l'expérience aurait pu nous l'indiquer. Nous avons cependant préféré l'interrompre et reprendre une expérience analogue avec de nouveaux animaux, et à un régime comportant dès le début 11 p. 100 d'acide phloïonique.

Pour tirer de la première expérience le maximum de renseignements, nous avons étudié d'une part l'élimination de l'acide phloïonique par les matières fécales, et d'autre part, procédé à la recherche de l'acide phloïonique dans les tissus des animaux.

ETUDE DE L'ELIMINATION DE L'ACIDE PHLOIONIQUE PAR LES MATIERES FECALES

Avant de sacrifier les deux lots d'animaux, nous avons recueilli leurs fèces pendant cinq jours et extrait les lipides éliminés dans leurs matières fécales en utilisant la technique suivante : au fur et à mesure de leur émission, on recueille dans l'alcool chlorhydrique au vingtième (alcool à 95° : 19 cm³, acide chlorhydrique (d = 1,19) : 1 cm³) l'ensemble des fèces des animaux témoins d'une part, et l'ensemble de ceux des animaux recevant de l'acide phloïonique d'autre part ; de cette manière, toute action bactérienne secondaire risquant d'altérer les lipides se trouve éliminée.

Les matières fécales sont soigneusement triturées au mortier avec du sable, et on fait passer la masse encore humide dans une capsule plate qu'on place au bain-marie jusqu'à dessiccation convenable. Le résidu sec est traité par l'eau distillée, et on sèche à nouveau à 100°, ce qui élimine l'acide chlorhydrique en excès.

Les lipides des fèces sont ensuite extraits par l'alcool chaud, comme nous le décrivons plus loin au sujet des lipides des différents tissus ; après avoir éliminé la majeure partie du solvant par distillation sous vide, on saponifie le résidu lipidique ; on reprend par de l'eau et chasse l'alcool restant par une nouvelle distillation sous pression réduite.

On obtient finalement une solution aqueuse de savons dont on sépare l'insaponifiable (1).

La solution savonneuse exempte d'insaponifiable est traitée par l'acide chlorhydrique jusqu'à réaction acide au tournesol ; les acides gras sont libérés ; on laisse

(1) La technique d'extraction des lipides, de leur saponification et de l'élimination de l'insaponifiable sera exposée plus loin en détails, cf. page 51.

reposer douze heures. Au bout de ce temps, on observe que les acides gras des fèces des témoins forment un gâteau surnageant un liquide brun parfaitement limpide, alors que les acides gras provenant des fèces des animaux recevant l'acide phloïonique précipitent franchement au fond du récipient.

On isole les acides gras précipités, les lave à l'eau et on vérifie leurs caractères de solubilité ; ceux provenant des animaux-témoins sont solubles dans l'éther et le chloroforme, contrairement à ceux provenant des animaux du lot B.

Les acides gras des fèces des animaux des rats du lot B sont mis en suspension dans l'eau, et traités dans une ampoule à décanter par l'éther sulfurique ; celui-ci dissout les acides gras ordinaires, tandis qu'un produit blanc, mal cristallisé, se rassemble à la surface de séparation des deux liquides ; on le recueille et le fait recristalliser dans l'eau. Après séchage, on en détermine le point de fusion, qui est de 120°.

Cet acide gras solide à point de fusion élevé, peu soluble dans l'éther et le chloroforme — contrairement aux acides gras provenant des fèces des témoins — insoluble dans l'eau froide, soluble dans l'eau bouillante et les solutions de soude et de potasse, avec formation de savons moussant abondamment, est donc l'acide phloïonique.

RECHERCHE DE L'ACIDE PHLOIONIQUE DANS LES DIFFERENTS TISSUS

Les animaux ont été sacrifiés après 83 jours d'expérience. L'examen macroscopique des viscères n'a révélé aucune anomalie, aussi bien dans le lot A que dans le lot B. Au cours de la dissection, les viscères creux du tube digestif — œsophage, estomac, intestin — ont été éliminés, car ils auraient pu contenir des fragments d'ali-

ments non encore transformés par la digestion. Nous avons finalement conservé trois fractions : la première fraction, que nous désignerons par « Peau », est constituée par le tégument externe et le tissu cellulaire sous-cutané ; la deuxième fraction comprend les « Viscères » (cerveau, poumons, cœur, foie, rein, rate, etc...) ; la dernière fraction, la « Carcasse », contient les lipides des muscles et de la moëlle osseuse.

Les différentes fractions d'animaux du même lot ont été rassemblées, de sorte qu'au total, nous avions les six échantillons suivants :

1° « Peau » lot A.
2° « Viscères » lot A.
3° « Carcasse » lot A.
4° « Peau », lot B.
5° « Viscères » lot B.
6° « Carcasse » lot B.

La peau a été coupée aux ciseaux en petits fragments, la carcasse passée au hache-viande et les viscères broyés au mortier en présence de sable.

Les six fractions ont été immédiatement soumises à une macération d'une durée de deux jours dans l'alcool froid, qui dissocie les complexes lipido-protéiques et dissout une partie des lipides.

L'alcool provenant de cette macération à froid a été séparé, et l'extraction a été poursuivie par l'alcool chaud, excellent solvant des lipides, dans l'appareil ci-dessous décrit (fig. 1) :

Un ballon à large ouverture de 250 cm^3 est surmonté d'une allonge de 30 cm. de hauteur et de 7 à 8 cm. de diamètre ; à cette allonge est adapté un réfrigérant ascendant ; l'extrémité inférieure de l'allonge plonge presqu'au fond du ballon. On place dans l'allonge un petit sac de toile contenant le produit à épuiser ; ce sac n'adhère pas à l'allonge grâce à une baguette de verre coudée à angle droit et appliquée contre sa paroi.

FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL A EXTRACTION

On place le ballon au bain-marie de telle sorte que son col corresponde au niveau de l'eau du bain-marie ; on le remplit d'alcool et on y adapte l'allonge surmontée de

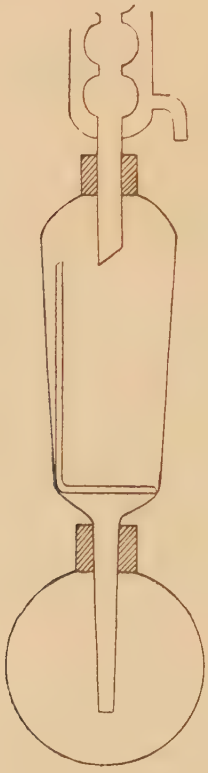


Fig. 1.

son réfrigérant et contenant déjà le sac. On chauffe. L'alcool bout, monte peu à peu dans l'allonge et très rapidement le sac baigne complètement dans l'alcool chaud ; les vapeurs de solvant qui atteignent le réfrigérant s'y condensent et retombent dans l'allonge.

Pour faciliter le brassage et le renouvellement de l'alcool de l'allonge, on peut refroidir le col du ballon avec de l'eau froide : l'alcool de l'allonge est refoulé dans le ballon. Quelques minutes après, l'alcool bout à nouveau et remonte dans l'allonge. On a intérêt à remplacer toutes les deux heures l'alcool d'extraction par une nouvelle quantité d'alcool.

Cette technique, qui permet d'épuiser rapidement le tissu dont on veut extraire les lipides, n'est qu'une variante du procédé d'extraction de Clark décrit par Bloor [24] dans son ouvrage bien connu.

Comme dans l'appareil de Clark, la substance à épuiser n'est pas en contact avec l'air, mais se trouve constamment dans l'atmosphère du solvant, ce qui réduit au minimum les risques d'oxydation par l'oxygène de l'air.

Mais alors que dans l'appareil de Clark, l'alcool condensé tombe goutte à goutte dans l'allonge, alors que dans les appareils du type Soxhlet ou Kumagawa, l'alcool de la cartouche refroidit assez rapidement, avec notre dispositif, au contraire, le sac contenant la substance à épuiser baigne complètement, et à tous moments, dans l'alcool chaud qui se trouve dans l'allonge, ce qui rend l'extraction aussi efficace et beaucoup moins longue qu'avec les appareils à extraction généralement utilisés.

Pour chaque catégorie de tissus « Peau », « Viscères », « Carcasse » et pour chaque lot, l'alcool de macération a été mélangé à l'alcool ayant servi à l'extraction à chaud ; le solvant a été éliminé sous pression réduite à 37°, et l'extrait lipidique saponifié par la potasse alcoolique ; après une nouvelle évaporation du solvant, le résidu était constitué par un mélange sec de savon et d'insaponifiable.

Ce mélange a été ensuite traité par l'éther sulfurique, qui dissout l'insaponifiable sans agir sur le savon. Pour nous assurer de l'élimination complète de l'insaponifiable, nous avons pris comme test la réaction de Liebermann : le résidu d'évaporation de l'éther repris par le chloroforme et additionné d'anhydride acétique et de quelques

gouttes d'acide sulfurique concentré doit rester incolore.

Initialement, nous avons épuisé au Soxhlet le mélange de savon et d'insaponifiable ; cette méthode exige peu de solvant, mais est très lente ; nous avons dû l'abandonner au bout d'une semaine, car le résidu de la dernière fraction d'éther contenue dans la cartouche donnait encore une réaction de Liebermann positive.

Nous avons alors traité le mélange de savon et d'insaponifiable par l'éther dans un tube à centrifuger : après centrifugation et décantation, on remplace l'éther décanté par une nouvelle quantité d'éther qu'on rejette de la même façon après centrifugation.

Nous avons pu ainsi séparer la totalité de l'insaponifiable de la « Peau », mais nous avons abandonné ce procédé trop laborieux pour un autre plus simple.

Nous avons finalement adopté la technique suivante :

Le savon est dissous dans l'eau ; la solution obtenue est agitée dans une ampoule à décanter avec l'éther sulfurique. Il se forme au début de l'opération une émulsion très difficile à rompre due probablement à la présence de polypeptides — c'est cette émulsion que nous avions voulu éviter en n'employant pas immédiatement cette technique classique.

On arrive cependant à rompre partiellement cette émulsion en la centrifugeant à 2.000 tours-minute après un repos prolongé de 48 heures ; l'éther surnageant la solution aqueuse de savon est éliminé puis remplacé par du nouvel éther jusqu'à ce que le résidu d'évaporation de la dernière fraction de solvant employée ne donne plus la réaction de Liebermann.

Cette dernière technique, bien qu'elle donne lieu à une émulsion très stable et qu'elle exige un volume important d'éther, est cependant la plus efficace et la moins longue.

La solution aqueuse de savon exempte d'insaponifiable a été traitée par l'acide chlorhydrique dilué jusqu'à réaction acide au tournesol ; après repos de douze heures, nous avons noté l'aspect des acides gras provenant des différentes fractions.

	Animaux du lot A	*Animaux du lot B*
« Peau » ...	Gâteau d'acides Gâteau d'acides gras surnageant un liquide limpide brun.	Gâteau d'acides gras surnageant un liquide trouble contenant en suspension un produit solide.
« Carcasse »	»	»
« Viscères ».	»	»

Les acides gras issus des différentes fractions ont été lavés à l'eau et séchés à 37°.

Ainsi qu'il a été signalé plus haut, les acides gras de la « Peau », des « Viscères » et de la « Carcasse » provenant des animaux du lot B formaient un gâteau surnageant une suspension ; au cours du lavage de ce gâteau, l'eau entraînait régulièrement du produit en suspension ; nous avons réuni les eaux de lavage et procédé à l'examen de la suspension.

CARACTERES DE LA SUSPENSION

1° Elle traverse les pores du papier filtre ordinaire.

2° Additionnée de soude à 10 p. 100 jusqu'à réaction alcaline, elle donne une solution limpide moussant par agitation. On peut revenir à la suspension en repassant en milieu acide.

Le produit solide en suspension est insoluble dans l'eau, l'éther et le chloroforme, soluble dans l'acétate d'éthyle.

4° Traitée par un volume égal d'alcool à 90°, la suspension fournit une solution parfaite ; il en est de même si on remplace l'alcool par l'acétone.

D'après ce sommaire examen, la conclusion qui s'impose est que la suspension est en majeure partie constituée par un acide gras différent des acides gras d'origine animale, et présentant plusieurs caractères d'identité de l'acide phloïonique.

Les acides gras de la « Peau », de la « Carcasse » et des « Viscères » des animaux du lot B ont été mis en suspension dans l'eau et traités dans une ampoule à décanter par l'éther sulfurique : celui-ci en a dissous la plus grande partie, tandis qu'un produit solide, mal cristallisé, s'est rassemblé à la surface de séparation des deux liquides Après avoir soutiré la couche aqueuse, nous avons recueilli le produit solide dans un bécher contenant quelques centimètres cubes d'eau distillée ; ce liquide a été ensuite chauffé légèrement pour éliminer complètement l'éther qui avait pu être entraîné, porté à l'ébullition et filtré à chaud. Nous avons constaté que le filtrat, d'abord limpide, se trouble peu à peu en refroidissant, en donnant une suspension qui disparaît, si on l'alcalinise à la soude, pour faire place à une solution savonneuse moussant abondamment par agitation ; après concentration de cette solution aqueuse au bain-marie, l'acidification par l'acide sulfurique dilué a déterminé la précipitation d'un produit bien cristallisé, insoluble dans l'eau froide, l'éther et le chloroforme, soluble dans l'alcool, l'acétone, l'acétate d'éthyle et la soude diluée.

Le précipité a été recristallisé dans l'eau, lavé, séché à 37° en vue de la détermination de son point de fusion.

Voici les points de fusion obtenus dans ces conditions pour chacune des fractions :

« Viscères » ..... 92°
« Carcasse » ..... 97°
« Peau » ..... 99°

Ces points de fusion, inférieurs à celui de l'acide phloïonique, sont cependant nettement supérieurs à celui de l'acide stéarique ; il s'agit donc d'acide phloïonique impur.

Comme il fallait s'y attendre, les acides gras des graisses des animaux-témoins présentaient les caractères habituels des acides gras normaux : entière solubilité dans l'éther et le chloroforme, densité inférieure à celle de l'eau.

En résumé, alors que dans les lipides des témoins, nous avons retrouvé uniquement les acides gras rencontrés habituellement dans les graisses d'origine animale, dans les lipides des animaux du lot B, au contraire, nous avons pu mettre en évidence un acide gras particulier, cristallisé, de densité supérieure à celle de l'eau, fondant au-dessus de 69°4 (point de fusion de l'acide stéarique) et présentant les caractères physiques— notamment la solubilité — et chimiques de l'acide phloïonique, précisément présent dans leur régime alimentaire.

La méthode de séparation employée plus haut pour l'isolement de l'acide phloïonique d'un mélange d'acides gras est très laborieuse ; elle ne nous a pas donné satisfaction et ne nous a pas permis d'obtenir des résultats quantitatifs. Nous avons été amené ainsi à rechercher une méthode fondée sur un tout autre principe lorsque nous avons sacrifié les animaux soumis à la deuxième expérience biochimique.

DEUXIEME EXPERIENCE

Cette deuxième expérience a été instituée en vue de nous rendre compte de la signification de l'écart observé entre le poids des témoins et celui des animaux du lot B à la fin de la première expérience.

Nous avons donc utilisé un régime analogue à celui qui avait été employé dans les dernières semaines de la première expérience, et même notablement plus riche en acide phloïonique. Toutefois, au lieu d'essayer de disperser l'acide phloïonique dans les lipides, nous avons tenté de le disperser dans les autres constituants du régime : amidon, protéine ; c'est pourquoi nous n'avons pas employé les acides gras de l'huile comme précédemment, mais l'huile elle-même, cette huile ayant le rôle d'apport lipidique et non de milieu de dispersion de l'acide phloïonique.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Huit rats blancs mâles d'un même élevage ont été divisés en deux lots A et B. Etant donné la régularité avec laquelle la croissance des témoins est observée, le lot A, nourri avec un régime normal, n'était constitué que par trois animaux d'une même portée ; le lot B, comportant cinq animaux, recevait le même régime additionné d'acide phloïonique.

Les régimes étaient les suivants :

Régime du lot A (témoins)

Caséine	20 g.
Blé finement moulu	40 g.
Mélange salin d'Osborne et Mendel	4 g.
Levure de bière sèche	6 g.
Huile d'olive	10 g.

Régime du lot B

Caséine	20 g
Blé finement moulu	40 g.
Mélange salin d'Osborne et Mendel	4 g.
Levure de bière sèche	6 g.
Acide phloïonique	10 g.
Huile d'olive	10 g.

Le régime des animaux du lot B comportait donc 22 p. 100 de lipides totaux, dont 11 p. 100 d'acide phloïonique.

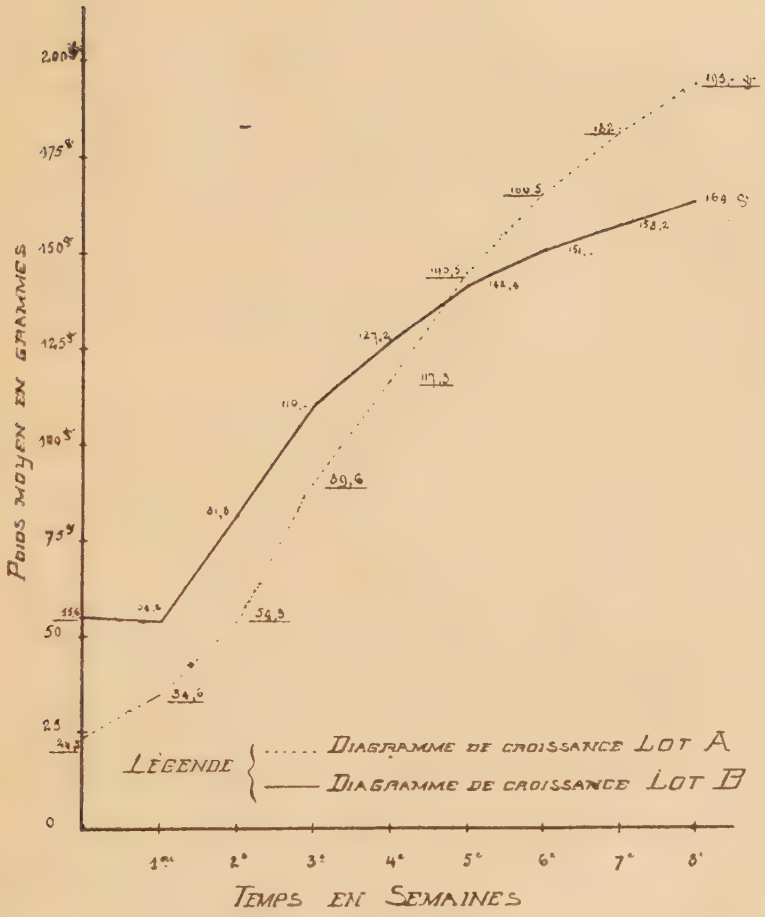
La nourriture était présentée sous forme d'une bouillie épaisse préparée en mélangeant intimement les composants solide, notamment l'acide phloïonique, qu'on faisait cuire dans de l'eau jusqu'à consistance convenable, l'huile n'étant ajoutée qu'à la fin de la cuisson.

Les rats des deux lots étaient nourris ad libitum et recevaient de plus une ration quotidienne de 15 U.I. de vitamine A et de 1,5 U.I. de vitamine D sous forme d'une solution huileuse.

Cette expérience a duré soixante jours : les animaux étaient pesés une fois par semaine en vue de l'établissement de leur courbe de croissance.

RESULTATS

Les courbes ci-dessous rendent compte de la vitesse de croissance des rats des deux lots.



Les trois animaux du lot A d'une même portée étaient âgés de 48 jours au départ et pesaient de 23 à 25 grammes.

Les cinq animaux du lot B étaient âgés de 60 jours au départ et pesaient entre 53 et 54 grammes.

Cette différence d'âge initial des animaux n'introduit pas de cause d'erreur dans l'interprétation des résultats, car la vitesse de croissance des rats reste normalement à peu près constante pendant la période où ils croissent de 20 à 150 grammes.

La courbe des témoins, d'abord située au-dessous de celle des animaux recevant l'acide phloïonique (lot B), lui est parallèle pendant trois semaines. A partir de ce moment, la courbe des rats du lot B commence à s'infléchir, coupe celle des témoins à la quatrième semaine, et la vitesse de croissance des animaux recevant de l'acide phloïonique diminue de plus en plus de la cinquième à la huitième semaine.

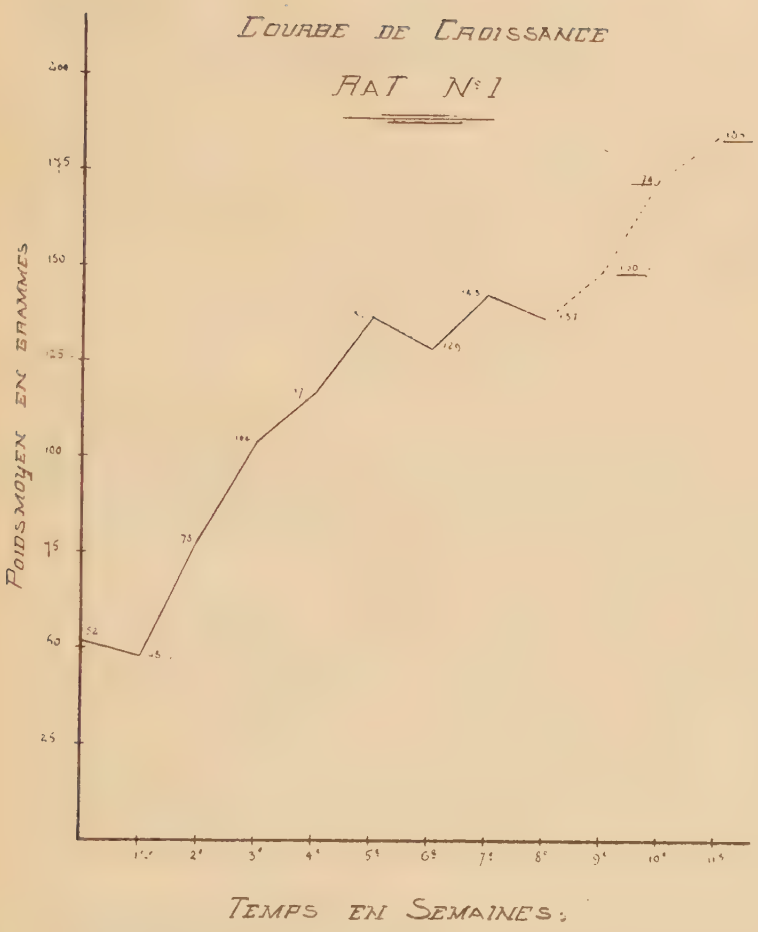
A la fin de l'expérience, la différence entre les poids moyens des animaux des deux lots était de 31 grammes, à l'avantage des rats du lot A.

La vitesse de croissance d'un des animaux du lot B, le rat n° 1, était irrégulière et nettement inférieure à celle des autres ; nous avons construit pour ce rat un diagramme individuel de croissance, bien que nous ayons tenu compte de son poids pour calculer le poids moyen des rats du lot B.

En vue de déceler si l'effet observé était dû à l'acide phloïonique, nous avons supprimé celui-ci de l'alimentation et conservé ce rat pendant 21 jours à un régime normal, après avoir sacrifié les quatre autres animaux du lot B ; la courbe ci-dessous montre que l'animal tend de plus en plus à reprendre une vitesse de croissance normale.

Le rat n° 1, devenu apparemment normal, est ensuite sacrifié ; à l'autopsie, le seul organe présentant une anomalie est le foie. L'aspect macroscopique est celui de la congestion hépatique au début. L'examen histologique confirme qu'il s'agit des premiers stades, sans altération du parenchyme glandulaire. Aucune surcharge lipidique des cellules hépatiques ; par contre, la disposition radiaire des travées de Remarck n'est plus toujours perceptible.

Pas de sclérose. On est frappé de l'abondance des hématies dans les capillaires intra-lobulaires : il s'agit d'une manifestation indéniable de congestion. Ces hématies sont souvent agglutinées et à limites devenues indistinctes, et on peut émettre l'hypothèse que certaines



peuvent être l'objet de désintégration dans laquelle doivent jouer les cellules de Küpffer (1).

(1) Nous remercions ici M. le Professeur R. Kehl, à l'obligeance duquel nous devons l'examen histologique.

ETUDE DE L'ELIMINATION DE L'ACIDE PHLOIONIQUE PAR LES MATIERES FECALES

Avant de sacrifier les animaux, nous avons recueilli leurs fèces pendant sept jours et extrait les lipides éliminés dans leurs matières fécales, en appliquant la même technique que dans l'expérience précédente :

1° Traitement à l'alcool chlorhydrique ;
2° Elimination du solvant et de l'acide par évaporation ;
3° Extraction par l'alcool chaud.

Après saponification des lipides extraits, l'étude qualitative et quantitative des acides gras éliminés a été faite, comme nous l'indiquons plus loin, en utilisant la solubilité dans l'eau du phloïonate de magnésium, qui permet de séparer facilement ce sel des savons des acides gras ordinaires insolubles.

Nous avons pu ainsi caractériser dans les fèces des animaux du lot B un acide gras peu soluble dans l'éther, dont les sels de sodium, de potassium et de magnésium sont solubles dans l'eau et qui fond à 113° ; ces caractères sont ceux de l'acide phloïonique. Des fèces des animaux témoins, nous avons par contre extrait un mélange d'acides gras entièrement soluble dans l'éther, fondant au-dessous de 50°, et dont le sel de magnésium est insoluble dans l'eau.

Le rapport acide phloïonique/acides gras totaux éliminé par les matières fécales des animaux du lot B a été également déterminé. Voici les résultats obtenus :

Acides gras dont le sel de magnésium est insoluble dans l'eau : 1 g. ;

Acides gras dont le sel de magnésium est soluble dans l'eau : 4,70 gr. ;

soit un rapport acide phloïonique/acides gras totaux égal à 82 p. 100.

RECHERCHE DE L'ACIDE PHLOIONIQUE DANS LES TISSUS DES ANIMAUX

Les animaux sacrifiés le soixantième jour de l'expérience ont été disséqués, en éliminant les viscères creux du tube digestif ; aucune anomalie n'a été constatée au cours de l'autopsie, aussi bien pour les trois rats-témoins que pour les quatre animaux du lot B.

Les fractions suivantes ont été séparées :

a) « Viscères » ;
b) « Carcasse » ;
c) « Peau ».

Les six fractions obtenues (3 pour les rats du lot A, 3 pour ceux du lot B) ont été recueillies immédiatement après leur récolte dans l'alcool à 90°, puis soumises à l'extraction par l'alcool chaud dans les conditions précédemment décrites.

Pour chaque catégorie de tissus « Peau », « Viscères », etc..., et pour chaque lot, l'alcool de macération a été mélangé à l'alcool ayant servi à l'extraction à chaud. Après évaporation du solvant sous pression réduite, à 37°, l'extrait lipidique a été saponifié par la potasse alcoolique à la température du bain-marie bouillant ; la liqueur savonneuse additionnée d'eau a été privée d'alcool par chauffage au bain-marie.

Nous avons obtenu enfin une solution aqueuse de savons que nous avons analysée en employant une technique différente de celle employée dans la premième expérience.

Ainsi qu'il a été démontré par A. Guillemonat et G. Césaire [14], le phloïonate de magnésium est soluble dans l'eau ; sa solubilité à 20° est de 9,5 g. par litre ; elle est beaucoup plus grande à chaud. Cette propriété nous a permis de tenter une méthode quantitative de séparation de l'acide phloïonique des acides gras d'origine

animale ; cette méthode est plus rapide que la précédente, car il est inutile d'éliminer l'insaponifiable.

En voici le principe : on traite la solution des savons par une solution de sulfate de magnésium ; on porte à l'ébullition et on filtre bouillant sur entonnoir de Büchner. Le précipité resté sur le filtre est constitué par les sels de magnésium des acides gras ordinaires ; en solution dans le filtrat alcalin, on a le sel de l'acide phloïonique, d'où on peut précipiter l'acide par addition d'un acide minéral.

Cette méthode a été utilisée pour isoler quantitativement l'acide phloïonique, et une partie aliquote du produit isolé a été purifiée en vue de la détermination du point de fusion.

Voici les points de fusion obtenus avec la substance précipitée du filtrat alcalin provenant des différentes fractions des rats dont le régime comportait de l'acide phloïonique.

Fractions	Point de fusion (bloc de Maquenne)
« Viscères »	104°
« Carcasse »	106°
« Peau »	112°

Cette substance est donc un acide gras dont le sel de magnésium est soluble dans l'eau et dont le point de fusion est plus élevé que celui des acides gras habituellement rencontrés dans les tissus animaux ; il s'agit donc d'acide phloïonique impur.

En travaillant dans les mêmes conditions sur la solution savonneuse obtenue à partir des lipides des animaux-témoins, nous avons constaté que les sels de magnésium formés étaient entièrement insolubles, et aucun précipité n'a été observé lors de l'acidification du filtrat alcalin par l'acide sulfurique dilué.

DOSAGE DE L'ACIDE PHLOIONIQUE DANS LES TISSUS

Un certain volume de solution aqueuse des savons totaux est traité par un excès de solution aqueuse à 10 p. 100 de sulfate de magnésium. On porte à l'ébullition et filtre à chaud sur entonnoir de Büchner ; le filtrat alcalin est recueilli ; on en précipite l'acide phloïonique par l'acide sulfurique dilué ; le précipité est lavé et pesé.

Le précipité de sels de magnésium resté sur le filtre est mis en suspension dans de l'eau et acidifié par l'acide sulfurique dilué ; on porte à l'ébullition, qu'on maintient 20 minutes environ : les acides gras régénérés surnagent la solution de sulfate de magnésium ; on les extrait par l'éther sulfurique. L'éther est lavé à l'eau puis évaporé ; il laisse un résidu constitué par les acides gras dont le sel de magnésium est insoluble dans l'eau. On pèse ce résidu.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau ci-dessous :

	Acides gras dont le sel de Mg est insoluble dans l'eau	Acide gras dont la sel de Mg est soluble dans l'eau	Acide phloïonique pour 100 g. d'acides gras totaux
« Viscères »	2,180 g.	0,020 g.	0,91 g.
« Carcasse »	6 g.	0,050 g.	0,83 g.
« Peau » ..	3 g.	0,060 g.	1,95 g.

En raison de la faiblesse du pourcentage d'acide phloïonique ainsi décelé dans les tissus, la microméthode de détermination de l'indice d'acétyle que nous avons décrite (page 30) ne nous aurait été d'aucun secours pour nos recherches biochimiques. La précision de cette méthode, de l'ordre de 5 p. 100, est insuffisante pour que les chiffres que nous aurions pu trouver soient significatifs. Dans le cas particulier des acides gras comportant deux hydroxyles situés en α l'un par rapport à l'autre, comme l'acide phloïonique, un seul hydroxyle se laisse acétyler,

ce qui diminue la sensibilité de leur dosage par le procédé de l'indice d'acétyle. Enfin, la détermination de l'indice d'acétyle est une méthode dénuée de spécificité ; elle ne donne aucun renseignement sur la nature des acides gras hydroxylés présents dans la matière grasse. Les graisses de certains animaux, en particulier du rat, au moins dans certaines circonstances, ont un indice d'acétyle appréciable ; des acides gras hydroxylés sont donc des constituants normaux de lipides animaux (R.-S. Harris, H. Shermann, E.-E. Lockhart [26]) ; il eût été indispensable de tenir compte de ce fait si nous avions voulu utiliser l'indice d'acétyle dans nos recherches biochimiques, mais il est clair que la comparaison des résultats obtenus chez les animaux des lots A et B eût été délicate. La méthode que nous avons décrite présente l'avantage d'être suffisamment spécifique et d'une exécution relativement commode.

CONCLUSIONS

Les résultats de l'expérience II confirment un certain nombre d'observations faites lors de l'expérience I.

La présence d'une petite quantité d'acide phloïonique dans le tissu adipeux sous-cutané, dans la carcasse et dans les viscères des animaux du lot B a été établie d'une façon incontestable. Ceci démontre qu'une partie de l'acide phloïonique introduit dans la ration a été absorbée par la muqueuse intestinale, malgré le point de fusion élevé de cet acide, entraînant les pertes importantes par la voie fécale que nous avons constatées.

Une légère diminution de la vitesse de croissance des rats avait été observée à la fin de l'expérience I, lorsque le taux d'acide phloïonique avait été porté à 5,5 p. 100 de la ration. L'expérience II, conduite avec une ration comportant dès le début 11 p. 100 d'acide phloïonique, a permis de constater une action défavorable sur la crois-

sance, se manifestant au bout d'environ trois semaines. Les animaux étant nourris ad libitum, il est peu vraisemblable que cette action soit due au défaut d'absorption d'une partie de la ration au niveau de la muqueuse intestinale. La diminution de la vitesse de croissance est-elle due à un déficit de la valeur énergétique de la ration, l'acide phloïonique aboutissant par scission de la chaîne en son milieu à deux molécules d'un diacide difficilement métabolisable ? Bien que cette dernière hypothèse puisse être retenue, nous ne pensons pas qu'un déficit énergétique relevant de ce mécanisme soit suffisant pour expliquer l'effet observé. L'accentuation progressive du retard de croissance, les lésions observées au niveau du foie chez un des animaux, sont bien plutôt en faveur d'une action nocive propre de l'acide phloïonique ou de l'un de ses produits de transformation.

Il est à remarquer ici que le mode d'introduction de l'acide phloïonique dans la nourriture des rats pendant l'expérience II a été très différent de celui qui avait été utilisé pendant l'expérience I. Devant les difficultés présentées par la dispersion de l'acide phloïonique dans les lipides, nous avons décidé d'incorporer le mieux possible l'acide phloïonique dans la partie de la ration apportant les glucides et les protides (blé, caséine), ainsi que nous l'avons indiqué dans le protocole expérimental. Il est possible que cette condition de préparation de la ration soit intervenue, conjointement avec l'augmentation de la dose ingérée, pour produire les manifestations défavorables.

TROISIEME EXPERIENCE

Les résultats peu favorables de l'expérience II, la préparation que nous avions effectuée entre temps d'un glycéride de l'acide phloïonique (voir partie chimique), et la connaissance des travaux de E.-E. Lockhart, H. Shermann et R.-S. Harris [25] nous ont amené à instituer une troisième expérience.

L'acide phloïonique fut introduit dans la ration sous la forme de glycéride, les courbes de croissance furent établies comme précédemment, mais de plus, des examens de sang furent pratiqués à la fin de l'expérience.

Nous avons recueilli également les matières fécales des animaux pendant les derniers jours de l'expérience en vue d'y doser l'acide phloïonique ; malheureusement, un accident nous a fait perdre la possibilité d'effectuer cette détermination. Il est incontestable cependant que l'acide phloïonique a été absorbé en partie par la muqueuse intestinale, puisque nous l'avons caractérisé et dosé dans les tissus des animaux qui en recevaient dans leurs aliments.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Huit rats blancs mâles d'un même élevage, âgés de 54 jours et pesant de 40 à 48 grammes, ont été divisés en deux lots A et B.

Les animaux du lot A servant de témoins étaient nourris ad libitum avec le régime suivant :

Caséine	20 g.
Blé moulu	40 g.
Mélange salin d'Osborne et Mendel	4 g.
Levure de bière sèche	6 g.
Huile d'olive	10 g.

Les rats du lot B recevaient dans les mêmes conditions le régime suivant :

Caséine	20 g.
Blé moulu	40 g.
Mélange salin d'Osborne et Mendel	4 g.
Levure de bière sèche	6 g.
Glycéride de l'acide phloïonique	8 g.
Huile d'olive	2 g.

Ce régime comportait donc 10 p. 100 de glycéride et 2,5 p. 100 d'huile destinée à apporter aux rats les acides éthyléniques indispensables à leur développement.

La nourriture était préparée en faisant cuire dans de l'eau le mélange salin, la levure, la caséine et le blé, jusqu'à obtention d'une bouillie épaisse, les lipides n'étant ajoutés qu'à la fin de la cuisson.

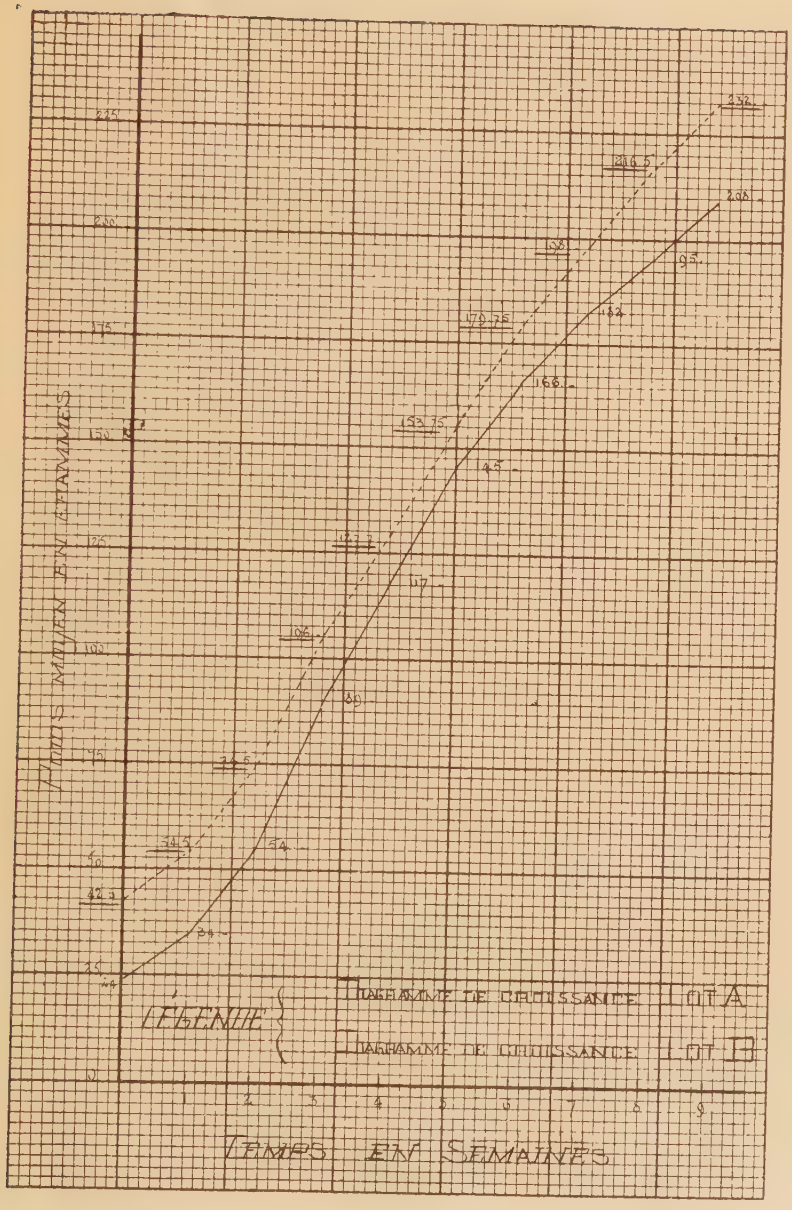
Chacun des huit animaux recevait de plus les vitamines A et D, comme dans les expériences précédentes.

Les rats étaient pesés une fois par semaine en vue de l'établissement de leur courbe de croissance.

RESULTATS

Les courbes ci-dessous rendent compte de la croissance des deux lots d'animaux.

Pendant les neuf semaines que dura l'expérience, les courbes de croissance des rats des lots A et B demeurèrent parallèles. La croissance des animaux recevant de l'acide


POIDS MOYEN EN GRAMMES
TEMPS EN SEMAINES
LÉGENDE
DIAGRAMME DE CROISSANCE LOT A
DIAGRAMME DE CROISSANCE LOT B

phloïonique fut donc parfaitement régulière et leur aspect demeura tout à fait normal.

⁂

E.-E. Lockhart, H. Shermann et R.-S. Harris [25] ont soumis des rats blancs à un régime comportant un glycéride de l'acide dihydroxy 9-10 stéarique et ont constaté après vingt à trente jours une baisse du taux de l'hémoglobine et une augmentation du temps de coagulation, bientôt suivies de l'apparition d'un syndrome hémorragique entraînant la mort de la plupart des animaux en moins de soixante-dix jours.

Au cours de notre troisième expérience, les rats du lot B recevant le glycéride de l'acide phloïonique n'ont présenté aucun symptôme de cet ordre.

Voici les résultats des examens de sang pratiqués à la huitième semaine de l'expérience pour chacun des animaux des lots A et B.

	Temps de coagulation	Taux d'hémoglobine (par colorimétrie)
4 animaux du lot A :		
N°s 1	2 minutes 30 sec.	70 p. 100
2	2 minutes	70 p. 100
3	2 minutes 15 sec.	85 p. 100
4	2 minutes 30 sec.	75 p. 100
4 animaux du lot B :		
N°s 1	2 minutes 15 sec.	80 p. 100
2	2 minutes 10 sec.	85 p. 100
3	2 minutes	85 p. 100
4	2 minutes	85 p. 100

Ajoutons qu'à l'autopsie des animaux, l'examen macroscopique des organes n'a révélé aucune anomalie.

DOSAGE DE L'ACIDE PHLOIONIQUE DANS LES TISSUS DES ANIMAUX DU LOT B

Après soixante-cinq jours d'expérience, les animaux ont été sacrifiés, puis disséqués en prenant soin de rejeter le tube digestif, pour éliminer les aliments non encore absorbés. Leurs tissus ont été répartis en trois fractions pour chaque lot :

« Viscères », « Carcasse », « Peau », dont la composition a été donnée lors de la description de l'expérience I.

L'extraction des lipides par l'alcool a été conduite comme précédemment, de même que leur saponification ; nous avons ainsi obtenu une solution aqueuse de savons dont nous avons traité un certain volume par l'acide chlorhydrique dilué pour libérer les acides gras.

N'ayant pas été entièrement satisfait par la méthode de dosage de l'acide phloïonique élaborée au cours de l'expérience II, nous avons utilisé cette fois un procédé fondé sur la solubilité du sel de calcium de l'acide phloïonique, procédé inspiré de la méthode d'extraction de l'acide phloïonique du liège [14] :

La liqueur acide contenant en suspension les acides gras est alcalinisée par la chaux vive ; après ébullition pendant plusieurs minutes et filtration, le filtrat limpide provenant de cette opération est concentré par distillation sous pression réduite ; ce filtrat contient les sels de calcium solubles dans l'eau, alors que le précipité est constitué par les sels des acides gras habituellement rencontrés dans les tissus.

L'acidification par l'acide sulfurique dilué du filtrat alcalin séparé des sels de calcium insolubles des acides gras provenant des animaux témoins n'a donné lieu à

aucun précipité ; la totalité des acides gras issus des lipides des tissus provenant des rats du lot A ont donc leur sel de calcium insoluble dans l'eau.

Au contraire, le traitement par l'acide sulfurique dilué du filtrat alcalin obtenu dans les mêmes conditions à partir des lipides des tissus provenant des animaux du lot B a déterminé la précipitation d'un acide gras qui a été isolé, lavé, séché et pesé.

Le précipité de sel de calcium resté sur le filtre et provenant des rats du lot B a été traité à chaud par l'acide sulfurique dilué ; après refroidissement, les acides gras régénérés ont été extraits à l'éther ; ce solvant, lavé puis évaporé, a laissé un résidu constitué par les acides gras ordinaires qui fut également pesé.

Après la pesée, les caractères physiques et chimiques de la fraction dont le sel de calcium est soluble dans l'eau ont été constatés : insoluble dans l'éther let le chloroforme, soluble dans l'alcool, l'acétone, l'eau bouillante, soluble dans la soude diluée en donnant une solution qui mousse par agitation. Elle a été ensuite purifiée par recristallisation dans l'eau en vue de la détermination du point de fusion.

	Point de fusion (bloc de Maquenne)
« Viscères »	120°
«Carcasse »	118°
« Peau »	119°

Ces propriétés sont celles de l'acide phloïonique ; le point de fusion observé est cette fois très près de celui de l'acide phloïonique pur.

Les poids des acides gras obtenus par la méthode ci-dessus sont les suivants :

	Acides gras dont le sel de Ca est insoluble dans l'eau	Acide gras dont le sel de Ca est soluble dans l'eau	Acide phloïonique pour 100 g. d'acides gras totaux
« Viscères »	4,100 g.	0,100 g.	2,200 g.
« Carcasse »	6,300 g.	0,050 g.	0,780 g.
« Peau » ..	8,500 g.	0,025 g.	0,290 g.

CONCLUSIONS

L'expérience III établit que l'acide phloïonique ingéré sous forme de glycéride peut être retrouvé en partie dans les graisses de réserve, les viscères et la carcasse des animaux.

Il serait imprudent de tenter une interprétation des différences observées entre les teneurs en acide phloïonique de ces diverses fractions provenant des animaux des lots B des expériences II et III ; en effet, les rats du lot B de l'expérience II n'étaient plus tout à fait normaux au moment où ils ont été sacrifiés. Le résultat le plus remarquable qui se dégage de l'expérience III est l'innocuité de l'acide phloïonique lorsqu'il est ingéré sous forme de glycéride.

COMPARAISON DES RESULTATS DES EXPERIENCES I, II ET III

Pendant la première phase de l'expérience I (54 jours), les rats du lot B reçurent un régime contenant 2,2 p. 100 d'acide phloïonique ; leur vitesse de croissance fut rigoureusement égale à celle des témoins et les animaux ne présentèrent aucune anomalie apparente. A la dose de 2,2 p. 100 du régime, l'acide phloïonique libre dispersé dans les acides gras de l'huile d'olive a été bien supporté. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par R. Harris, H. Shermann et E.-E. Lockhart [26] dans une série d'expériences au cours desquelles ils utilisèrent un glycéride de l'acide dihydroxy 9-10 stéarique à des doses voisines de 2 p. 100 du régime. Les auteurs constatèrent chez les animaux recevant ce régime un léger avantage par rapport aux témoins.

Au contraire, lorsque E.-E. Lockhart, H. Shermann et R. Harris [25] utilisèrent, à la dose de 25 p. 100 du régime le triglycéride formé d'une molécule d'acide dihydroxy 9-10 stéarique et de deux molécules d'acides gras ordinaires, ils observèrent un syndrome hémorragique suivi de mort. L'acide dihydroxy 9-10 stéarique bien toléré à faible dose ne l'est donc plus à des doses plus élevées. Il semble bien qu'il en soit de même pour l'acide phloïonique, puisque la première phase de l'expérience I s'est traduite par une croissance normale des animaux, alors que notre expérience II, conduite avec un régime contenant 11 p. 100 d'acide phloïonique, s'est traduite par un résultat nettement défavorable à cet acide, sans toutefois qu'apparaissent des troubles analogues à ceux observés

par E.-E. Lockhart, H. Sherman et R.-S. Harris [25] dans le cas de l'acide dihydroxy 9-10 stéarique.

Notre expérience III soulève une autre question : quelle est l'influence de la forme sous laquelle est donné l'acide phloïonique ? Autant qu'il soit permis de tirer des conclusions fermes d'une seule expérience, nous pensons que l'acide phloïonique est beaucoup mieux toléré lorsqu'il est administré à l'état de glycéride qu'à l'état libre.

POUVOIR HEMOLYTIQUE DU PHLOIONATE DE SODIUM

Les propriétés hémolytiques des savons étant bien connues et d'autre part, les travaux de E.-E. Lockhart, H. Sherman et R.-S. Harris ayant attiré l'attention sur les modifications sanguines qui surviennent après ingestion prolongée d'un glycéride de l'acide dihydroxy 9-10 stéarique, nous avons jugé utile de comparer le pouvoir hémolytique du phloïonate de sodium à celui des autres savons.

L'étude du pouvoir hémolytique du phloïonate de sodium a été effectuée sur des hématies de cheval suivant la technique utilisée par Cavier [27] :

Dans une série de tubes à hémolyse, on mesure des quantités décroissantes, comprises entre 1 cm^3 et 0,05 cm^3, d'une solution au dixième de phloïonate de sodium dans un tampon isotonique à pH 7 ; celui-ci s'obtient en diluant au cinquième la solution tampon de Clark et Lubs avec de l'eau chlorurée à 8 p. 1.000.

On complète à 1 cm^3 avec de l'eau chlorurée. Le pH du mélange est égal à 7,4.

On ajoute alors une goutte de suspension d'hématies, celles-ci ayant été préalablement séparées du plasma, lavées soigneusement avec une solution de chlorure de sodium à 8 p. 1.000 et remises en suspension dans ce même liquide. On agite le tout et on laisse reposer. Au bout d'une heure, on centrifuge et on note les tubes où s'est produite l'hémolyse ; celle-ci commence dans le tube contenant 0,5 cm^3 de solution de phloïonate de sodium à 10 p. 100.

Donc, à pH 7,4, la concentration moléculaire minima hémolytique du phloïonate de sodium est de :

$$\frac{50 \cdot 10^{-3}}{390} = 12 \cdot 10^{-5}$$

Voici, d'après Cavier [27], les concentrations moléculaires minima hémolytiques de différents savons à pH 7,4 ; ces concentrations ont été déterminées sur des hématies de chien ; on peut toutefois les retenir, puisque, selon l'auteur, un même savon se comporte d'une façon sensiblement analogue, quelle que soit l'origine des hématies.

Oléate	3,29.	10^{-7}
Linoléate	2,65.	10^{-7}
Linolénate	2.	10^{-7}
Ricinoléate	6,25.	10^{-7}
Laurate	18.	10^{-7}
Myristate	6.	10^{-7}
Oxystéarate	2,48.	10^{-7}
Trioxystéarate	22,6.	10^{-7}

Lorsqu'on compare ces chiffres à celui trouvé pour le phloïonate de sodium, il apparaît que son pouvoir hémolytique est très faible par rapport à celui des autres savons.

La question de la relation qui existe entre pouvoir hémolytique et structure moléculaire étant encore obscure, nous ne la discuterons pas ici, nous contentant pour le moment d'enregistrer les résultats d'expériences.

CONCLUSIONS GENERALES

Utilisant la solubilité dans l'eau du phloïonate de calcium, propriété signalée par A. Guillemonat, nous avons élaboré avec lui une méthode de préparation de l'acide phloïonique à partir du liège. Cette méthode, d'une exécution commode et assez rapide, fournit un rendement de 30 grammes par kilog de liège, c'est-à-dire huit fois supérieur à celui de la méthode de Zetzsche, seule méthode antérieurement décrite.

Nous pensons que notre méthode de préparation de l'acide phloïonique fournit une estimation de la quantité d'acide phloïonique contenue dans le liège ; cet acide entrerait donc pour 3 ou 4 p. 100 dans la constitution du liège.

Les caractères chimiques de l'acide phloïonique sont ceux d'un diacide-dialcool. Nous avons constaté que le procédé classique de détermination de l'indice d'acétyle n'est pas applicable à l'acide phloïonique, ce qui nous a conduit à mettre au point une technique fondée sur le même principe, mais dont les opérations sont effectuées à l'échelle semi-microanalytique ; cette technique présente de plus l'avantage de n'exiger qu'une petite quantité de matière première et de réactifs. L'indice d'acétyle de l'acide phloïonique trouvé par notre technique a été 172,9 (moyenne de six déterminations). Cet indice calculé pour l'acétylation d'un seul hydroxyle est 173,4. Le produit obtenu est donc le dérivé monoacétylé, comme cela est la règle lorsque les deux hydroxyles sont en α l'un par rapport à l'autre.

Il y aurait lieu de tenir compte de ce fait si la déter-

mination de l'indice d'acétyle était utilisée en vue de l'estimation de la teneur en acide phloïonique de produits d'origine biologique.

Pour nos recherches biochimiques, nous avons élaboré des méthodes pondérales de dosage de l'acide phloïonique fondées sur la solubilité dans l'eau des sels de magnésium et de calcium de cet acide et l'insolubilité de l'acide libre. C'est au moyen de ces méthodes qu'a été dosé l'acide phloïonique dans les tissus et les matières fécales des animaux soumis à un régime comportant cet acide.

Nous avons institué successivement trois expériences au cours desquelles nous avons introduit l'acide phloïonique de diverses manières dans la nourriture de jeunes rats albinos.

De l'ensemble de ces expériences, il ressort que l'absorption de l'acide phloïonique par la muqueuse intestinale est médiocre, mais cependant appréciable, puisque cet acide a pu être dans tous les cas décelé ou dosé dans le tissu adipeux, la carcasse et les viscères des animaux qui en recevaient dans leur nourriture.

A la dose de 2,2 p. 100 du régime, l'acide phloïonique libre dispersé dans les acides gras de l'huile d'olive a été bien supporté pendant une expérience d'une durée de 54 jours. A la dose de 11 p. 100 du régime, l'acide phloïonique libre dispersé dans la fraction protidique et glucidique du régime a été responsable d'une diminution très nette de la vitesse de croissance des rats en expérience, après environ trois semaines de croissance normale.

A la dose de 10 p. 100 du régime, un glycéride de l'acide phloïonique n'a provoqué aucune baisse de la vitesse de croissance des rats pendant une expérience d'une durée de neuf semaines.

Au cours de toutes nos expériences, l'aspect des animaux et leur comportement sont restés normaux. L'autopsie n'a révélé d'anomalie que pour un seul animal appartenant au lot ayant reçu l'acide phloïonique libre à la dose de 11 p. 100 du régime ; il s'agissait d'un état congestif du foie.

Notre attention ayant été attirée sur l'anémie et les troubles de la coagulation du sang observés par certains auteurs américains qui avaient fait ingérer à des rats un glycéride de l'acide dihydroxy 9-10 stéarique, nous avons, au cours de notre troisième expérience, déterminé le temps de coagulation et le taux de l'hémoglobine. Aucune anomalie n'a été notée. En aucun cas, au cours de nos trois expériences, il n'est apparu de syndrome hémorragique.

En résumé, pour autant que le petit nombre de nos expériences permette d'être affirmatif, l'acide phloïonique est bien supporté par le rat blanc lorsqu'il est administré à l'état libre dans la nourriture à une dose de l'ordre de 2 p. 100 du régime ou bien sous forme de glycéride, à la dose de 10 p. 100 de ce composé mélangé à la nourriture.

Ces résultats pourraient être utilisés comme première indication sur la posologie et le mode d'administration de l'acide phloïonique dans le cas où certaines propriétés de cet acide indiqueraient un usage thérapeutique possible.

Enfin, nous avons observé que le pouvoir hémolytique du phloïonate de sodium est notablement inférieur à celui de la plupart des savons.

BIBLIOGRAPHIE

16. André E. — Sur l'indice d'acétyle des corps gras. Méthode simple et rapide pour sa détermination. *Bull. Soc. Chim. France*, 1925, *37*, 335.
19. Bayley A.-E. — Industrie et technologie des corps gras.
23. Bernhard K. — *Helvetica chimica Acta*, 1941, *24*, 1412. et Dégradation biologique des acides gras — Conférence. *Archives des Sciences physiologiques*, 1948, *2*, 185.
24. Bloor W.-R. — Biochemistry of the fatty acids, and their compounds, the lipids. New-York, Reinhold Publ. corporation, 1943.
7. Braütigam. — *Pharmazie Centralhalle*, 1898, *39*, 38.
27. Cavier R. — Le pouvoir hémolytique des savons alcalins. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1937, *19*, 1.663.
17. Césaire O.-G. — Sur la détermination de l'indice d'acétyle, *Bull. Soc. Chim. France*, 1949, *16*, 704.
1. Chevreul. — *Annales de Chimie*, 1807, *62*, 323.
13. Criegee, Kraft, Rank. — *Ann. der. Chemie*, 1933, *507*, 159.
18. Delaby R., Breugnot Y. — Sur la détermination rapide de l'indice d'acétyle des corps gras. *Bull. des Sciences Pharm.*, 1932, *39*, 354.
22. Emmrich R., Emmrich-Glaser I. — Stoffvechselversuche mit höheren geradzahligen gesättigten Dicarbonsaüren. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1940, *266*, 183.
4. Flückiger. — *Arch. d. Pharmazie*, 1890, *228*, 690.
5. Gilson. — *La Cellule*, 1890, *6*, 87.
6. Gilson. — La subérine et les cellules du liège. *Diss. Strasbourg*, 1890.
15. Guillemonat A. — Brevet français 1941, N° 921-419.
14. Guillemonat A., Césaire O.-G. — Sur la constitution chimique du liège. *Bull. Soc. Chim. France*, 1949, *16*, 792.

26. Harris R.-S., Shermann H., Lockhart E.-E. — Effect of glycerides of hydroxy fatty acids upon growth and development. *Archives of Biochemistry*, 1944, *5*, 63-70.
2. Kügler. — *Diss. Strasbourg*, 1884.
3. Kügler. — *Arch. d. Pharmazie*, 1884, *222*, 217.
25. Lockhart E.-E., Shermann H., Harris R.-S. — Dihydroxystéaric acid and vitamine K deficiency. *Science*, 1942, *96*, 542.
10. Scurti F., Tammasi G. — *Gazz. Chim. Ital.*, 1916, *46*, 159.
9. Schmidt. — *Monatshefte*, 1904, *25*, 277 et 302.
8. Thoms. — *Pharmazie Centralhalle*, 1898, *39*, 699.
20. Verkade P.-E., van der Lee J., van Alphen A.-J.-S. — Futterungsversuche an Hunde mit den Natriumsalzen normaler gesättigter Dicarbonsaüren. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1937, *250*, 47.
21. Verkade P.-E., van der Lee J., van Alphen A.-J.-S. — Injectionversuche an Hunden mit den Natriumsalzen normaler gesättigter Dicarbonsaüren. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1938, *252*, 163.
11. Zetzche F., Sonderegger G. — Untersuchungen über den Kork III. *Helvetica chimica Acta*, 1931, *14*, 632.
12. Zetzsche F., Weber K. — Untersuchungen über den Kork IX. Die Konstitution der Phloïon-Phloïonolsaüre *Journal für praktische Chemie*, 1937, *150*, 140.

TABLE DES MATIERES

PRÉFACE 13

INTRODUCTION 15

PARTIE CHIMIQUE :

1) Constitution de l'acide phloïonique 19
2) Préparation de l'acide phloïonique :
   a) Méthode de Zetzsche et Sonderegger 21
   b) Méthode de Guillemonat et Césaire 25
3) Propriétés de l'acide phloïonique 27
4) Conclusion à la partie chimique 35

PARTIE BIOCHIMIQUE :

1) Expérience de nutrition :
   a) Première expérience 43
   b) Deuxième expérience 57
   c) Troisième expérience 69
2) Comparaison des résultats des expériences I, II et III 77
3) Pouvoir hémolytique du phloïonate de sodium 79

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 81

BIBLIOGRAPHIE 85

QUESTION PROPOSÉE PAR LA FACULTÉ

RELATIONS ENTRE LES VITAMINES DU GROUPE B ET CERTAINS ENZYMES

Vu : Le Doyen

Vu : Le Président de Thèse

Vu et permis d'imprimer :
Alger, le
Le Recteur